Aus dem Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Abteilung für Mikrobiologische Chemie
(Leiter: Prof. Dr. K. Ring)

IST DER AKTIVE TRANSPORT NEUTRALER AMINOSÄUREN BEI STREPTOMYCES HYDROGENANS CARRIER- ODER ENERGIE-LIMITIERT ?

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der theoretischen Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
THOMAS THARAYIL
aus
Kaipuzha/Kerala

Frankfurt am Main
1983

Aus dem Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Abteilung für Mikrobiologische Chemie
(Leiter: Prof. Dr. K. Ring)

IST DER AKTIVE TRANSPORT NEUTRALER AMINOSÄUREN BEI STREPTOMYCES HYDROGENANS CARRIER- ODER ENERGIE-LIMITIERT ?

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der theoretischen Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
THOMAS THARAYIL
aus
Kaipuzha/Kerala

Frankfurt am Main
1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H.J.Müller

Referent: Prof. Dr. rer. nat. K.Ring

Koreferent: Prof. Dr. med. H.Knothe

Tag der mündlichen Prüfung:4. 7. 1983

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	5
2.1	Materialien	5
2.2	Methoden	7
2.2.1	Züchtung der Zellen	7
2.2.2	Puffer	9
2.2.3	Herstellung der Zellsuspension	9
2.2.4	Bestimmung der Transportraten	10
2.2.5	Extraktion der Adeninncleotide	12
2.2.6	Bestimmung der Adeninnucleotide in Zellextrakten	14
2.2.7	Membranpotentialbestimmung	18
2.2.8	Bestimmung der pH-Änderung im Außenmedium	18
3	Methodische Vorarbeiten	21
3.1	Optimierung der Adeninnucleotidbestimmung	21
3.1.1	Vergleich verschiedener Extraktionsverfahren	21
3.1.2	Einfluß der Zellmenge auf das Extraktionsergebnis	21
3.1.3	Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Adenin-nucleotidspiegel	23
3.2	Messung des Membranpotentials	26
3.2.1	Allgemeines	26
3.2.2	Möglichkeiten zur Bestimmung des Membranpotentials	27
3.2.3	Einfluß von TPP^+ auf die AIB-Aufnahme und die ATP-Spiegel bei Streptomyces hydrogenans	29

3.2.4 Untersuchungen zur Aufnahme von ^{3}H-TPP^{+} 30
3.2.5 Abhängigkeit der TPP^{+}-Aufnahme von der Zeit und vom Inkubationspuffer 32
3.2.6 Eichung der Membranpotentialbestimmung mit TPP^{+} durch Messung der $^{86}Rb^{+}$-Verteilung in Gegenwart von Nonactin 32

4 Ergebnisse 36

4.1 Einfluß der Wachstumsphase auf AIB-Transport und Adeninnucelotidspiegel 36

4.2 Einfluß der Inkubationsbedingungen auf die Transportkapazität für AIB, den Adeninnucleotidgehalt und die AEC bei Zellen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase 38

4.3 Einfluß der Hemmung der Proteinsynthese auf die Transportkapazität, den Adeninnucleotidgehalt und die AEC 42

4.4 Einfluß von Stoffwechselhemmstoffen auf AIB-Transport und Adeninnucleotidgehalt 44
4.4.1 Oligomycin 44
4.4.2 Dicyclohexylcarbodiimide 45
4.4.3 2-Desoxy-D-Glucose 45
4.4.4 KCN 46

4.5 Membranpotential und AIB-Transport 47
4.5.1 Membranpotential und AIB-Transport in wachsenden Zellen 47
4.5.2 Membranpotential und AIB-Transport in nicht-wachsenden Zellen; Einfluß von Substraten und Chloramphenicol 48
4.5.3 Membranpotential und Hemmstoffe des Energiestoffwechsels 49
4.5.3.1 FCCP 49
4.5.3.2 Nigericin 50

4.5.3.3 Nonactin 53

4.5.3.4 Inkubation unter Anaerobiose 54

4.5.4 Abhängigkeit des Aminosäuretransportes von der Größe des Membranpotentials 55

4.5.4.1 Veränderung des Membranpotentials durch Nonactin in Gegenwart von K^+ 55

4.5.4.2 Veränderung des Membranpotentials durch Aminosäuretransport 56

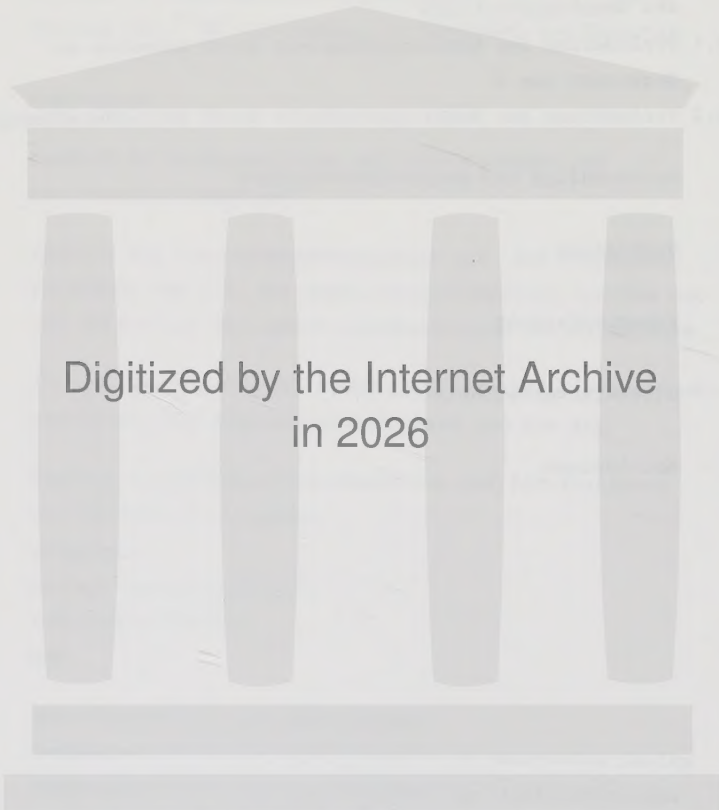
4.6 Protonenfluß und Aminosäuretransport 57

5 Diskussion 58

6 Zusammenfassung 62

7 Literaturverzeichnis 64

8 Abbildungen 71


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523704_0032

1 Einleitung

Jede Zelle steht in ständiger stofflicher Kommunikation mit ihrer Umwelt. Diese Kommunikation ist jedoch eingeschränkt, da die Zellmembran aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung und Architektur nur begrenzt permeabel ist: Während lipophile Moleküle die Membran ungehindert passieren können, sind die Flüsse hydrophiler Substanzen limitiert.

Bakterien nehmen - wie eukaryotische Zellen - ihre Nährstoffe aus dem Medium mit Hilfe substratspezifischer Transportsysteme auf, von denen ihnen eine breite Vielfalt zur Verfügung steht. In vielen Fällen werden die Substrate (Aminosäuren, Zucker, Nucleoside, Vitamine, bestimmte Antibiotika, Ionen) aktiv, d.h. gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert; nicht selten ist die im Steady State erreichte intrazelluläre Substratkonzentration um einen Faktor von 1000 höher als die extrazelluläre.

Ein solcher aktiver Transport setzt die Existenz eines Carriers in der Membran und die Kopplung der Substrattranslokation mit einer Energiequelle voraus. Nach heutigen Vorstellungen läßt sich der unidirektionale, zelleinwärts gerichtete Transport in fünf Einzelschritte aufteilen:
(1) An der Membranaußenseite Bindung des Substrates an den aktivierten Carrier: Bildung des Substrat-Carrier-Komplexes.
(2) Translokation des Substrates durch die Membran, vermutlich auf dem Weg über eine Konformationsänderung des Carrierproteins.
(3) An der Membraninnenseite Freisetzung des Substrates durch Dissoziation des Carrier-Substrat-Komplexes.
(4) Inaktivierung des Carriers: Verlust der Affinität zum Substrat an der Membraninnenseite.
(5) Reorientierung der Substratbindungsstelle des Carriers zur Membranaußenseite und Wiederherstellung der Affinität zum Substrat.

Beim aktiven Transport ist einer dieser Schritte mit einer energieliefernden Reaktion verknüpft. Die Energie kann aus verschiedenen Quellen stammen: Aus der Spaltung von ATP, aus dem zelleinwärts gerichteten H^+-Gradienten (Δ pH) oder aus dem Membranpotential ($\Delta\Psi$). Die aus Δ pH und $\Delta\Psi$ entstehenden Triebkräfte werden als "Proton Motive Force" (PMF) zusammengefaßt (Mitchell, 1966).

Welche dieser Möglichkeiten benutzt wird, hängt von der transportierten Substanz ab. Bei E.coli wurde die Abhängigkeit der Aufnahme bestimmter Aminosäuren (Glutamin, Methionin, Histidin, Ornithin und Arginin) von ATP oder einem mit Hilfe von ATP phosphorylierten Produkt (X-P) durch Berger (1973) und Berger und Heppel (1974) nachgewiesen; die Aufnahme dieser Aminosäuren war unabhängig von der PMF. Gleiches trifft bei E.coli für den Transport von D-Galaktose (Wilson, 1974), D-Ribose (Curtis, 1974) und Glycylglycin (Cowell, 1974) zu. Rhoads und Epstein (1977, 1978) beschrieben, daß für den Transport von K^+ in E.coli K12 sowohl X-P als auch PMF als Triebkräfte dienen. PMF ist Triebkraft für die Aufnahme von Glycin, Alanin, Serin, Threonin und NH_4^+ bei Sc. faecalis (Asghar et al., 1973) und für Lysin und Isoleucin bei Staph.aureus (Niven und Hamilton, 1974), während Δ pH Triebkraft für die L-Glutamataufnahme bei Staph.aureus ist (Niven und Hamilton, 1974). In den Fällen, in denen ΔpH als Triebkraft dient, findet ein Cotransport zwischen H^+ und Substrat statt (West und Mitchell, 1973; Eddy und Novacki, 1971; Cockburn et al., 1975; Collins et al., 1976). Bei S.hydrogenans wurde bisher nur die Beteiligung von $\Delta\Psi$ an der Energetisierung des Aminosäuretransportes nachgewiesen (Fritsch, 1982); detailliertere Untersuchungen liegen noch nicht vor.

Man weiß seit langem, daß bei Bakterien die Transportraten für viele Substrate keine konstanten Größen darstellen, sondern re-

guliert und letzten Endes damit dem aktuellen Bedarf angepaßt werden können. Eine solche Veränderung ist theoretisch auf verschiedene Weise möglich: Durch Veränderung der Konzentration des betreffenden Carriers in der Membran bei Energieüberschuß, durch Veränderung der Energiezufuhr bei Carrierüberschuß, und durch Modulation der Carrieraktivität bei ausreichend hoher Carrierkonzentration und Energiezufuhr.

Im ersten Fall wird auf genetischer Ebene die Synthese von Carrierprotein durch Induktion stimuliert oder durch Repression vermindert. Hierfür sind zahlreiche Beispiele bekannt (Zusammenfassung bei Payne, 1980). Im zweiten Fall ist die Energieversorgung transportlimitierend, d.h. bereits geringfügige Schwankungen in der Bereitstellung der für den Transport erforderlichen spezifischen Energieform oder in der Kopplungsreaktion verändern die Transportrate. Im Zusammenhang mit der Frage der Transportregulation liegen hierüber noch keine direkten Informationen vor. Im dritten Fall wird die Aktivität des energetisch ausreichend versorgten Carriers durch Feedbacksysteme gesteuert: So können bestimmte, intrazelluläre freie Aminosäuren die Aktivität ihrer Transportsysteme hemmen (Ring und Heinz, 1966; Ring et al., 1970), Aminosäurederivate, insbesondere aktivierte Aminosäuren die Carrieraktivität erhöhen (Groß et al., 1970).

Limitierend für den Transport ist im ersten Fall also die Carrierkonzentration, im zweiten Fall die Energiezufuhr, im dritten Fall das Konzentrationsverhältnis zwischen stimulierenden und inhibierenden Effektoren. Da für verschiedene Substrate auch verschiedene Carrier zur Verfügung stehen, kann auf diesem Weg die Substrataufnahme in die Zelle individuell gesteuert werden.

Nachdem in früheren Untersuchungen festgestellt worden war,

daß bei S.hydrogenans der Transport neutraler Aminosäuren durch Induktion (Ring, 1969) und Feedbacksysteme (Ring et al., 1970; Groß et al., 1970)gesteuert wird, sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob unter bestimmten physiologischen Umständen auch die Energieversorgung transportlimitierend werden kann. Aus diesem Grund wurden an wachsenden und ruhenden Zellen vergleichend mit der Transportkapazität für 2-Aminoisobuttersäure das Membranpotential, die Adeninnucleotidspiegel und die Adenylate-Energy-Charge (AEC) bestimmt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Aminosäuren

2-Aminoisobuttersäure, L-Leucin und L-Isoleucin waren Präparate der Firma Serva, Heidelberg. L-Alanin, L-Asparaginsäure, D-Glutaminsäure wurden von der Firma Fluka AG, Buchs, Schweiz, L-Glutaminsäure von Merck, Darmstadt, und Cycloleucin von Calbiochem, Los Angeles, USA, bezogen. Dabei handelte es sich entweder um reinste oder p.a. Präparate.

2.1.2 Radioaktive Substanzen

2-Aminoisobuttersäure (1-^{14}C), L-Glutaminsäure (U-^{14}C), L-Asparaginsäure (U-^{14}C), L-Arginin-(U-^{14}C)-monohydrochlorid, L-Alanin (U-^{14}C), und $^{86}Rb^{+}$ wurden von Amersham Buchler, L-Leucin (1-^{14}C) von NEN bezogen. ^{3}H-Tetraphenylphosphoniumchlorid (4,33 mCi/mMol) war ein Produkt der Hoechst AG, Frankfurt.

2.1.3 Hemmstoffe

Oligomycin, Nonactin, Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP), Chloramphenicol, Gramicidin und Antimycin A waren Präparate der Firma Boehringer,Mannheim. KCN, Dicyclohexylcarbodiimid, und 2,4-Dinitrophenol wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Valinomycin erhielten wir von Serva, Heidelberg, und Jodessigsäure (Natriumsalz) von Merck Schuchard, Hohenbrunn.

2.1.4 Enzyme und Substrate

Myokinase, Pyruvatkinase, Phosphoenolpyruvat und Adeninnucleotide wurden von der Firma Boehringer Mannheim bezogen. Luciferin und Luciferase aus Photinus pyralis von der Firma Boehringer Mannheim und Serva, Heidelberg.

2.1.5 Sonstige Materialien

Bacto-Beef-Extract, Bacto-Yeast-Extract und Bacto-Agar waren Präparate der Difco Laboratories Detroit, USA, N-Morpholinoäthansulfonsäure (MES), Glycylglycin, Albumin aus Rinderserum und 2-Deoxiglucose waren Präparate der Firma Serva, Heidelberg; Triton X-100 wurde von Roth, Karlsruhe, geliefert, Stickstoff erhielten wir von Messer Griesheim. Die übrigen, zur Herstellung der Lösungen verwandten Chemikalien wurden als reinste oder p.a. Präparate von der Firma Merck, Darmstadt geliefert. Als Membranfilter wurden verwendet: Von Sartorius, Göttingen: Typ AM 11308, 0,15µ Porengröße; von Millipore, Neu-Isenburg: Typ AAWP, 0,45µ Porengröße; von BioRad, München: Typ Unipore Polycarbonat, 0,4µ Porengröße.

2.2 Methoden

2.2.1 Züchtung der Zellen

2.2.1.1 Stammkultur

Streptomyces hydrogenans (Lindner et al., 1958) wurde als Stammkultur bei 30°C auf Haferflockenschrägagar (Tab.1) gezüchtet und in Intervallen von 8 - 12 Wochen neu überimpft. Die Stammkulturen wurden bei 11°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 1

Haferflockenschrägagar

Haferflocken	30,0g
NaCl	2,5g
Agar	20,0g

Diese Komponenten wurden in 1 Liter 10%igem Erdextrakt gelöst, aufgekocht, auf pH 7,2 eingestellt und 5 Minuten bei 1,5 atm autoklaviert. Zur Herstellung des Erdextraktes wurde 1 kg Walderde 1 Stunde bei 1,5 atm mit 2 Liter Wasser extrahiert und anschließend filtriert.

2.2.1.2 Kulturen in Vollmedium

Für experimentelle Zwecke wurden zunächst Zellen von der Stammkultur zur Adaptation in 100 ml Vollmedium (Tab.2) überimpft und in einem 300 ml Erlenmeyerkolben 24 Stunden in einem Rundschüttler (New-Brunswick) bei 30°C und 180 Opm inkubiert. Während dieser Zeit erreichten die Zellen die stationäre Phase.

Mit 2 ml einer solchen Vorkultur wurden 1,5 l Vollmedium in einem 2-Liter Stehkolben (Hauptkultur) beimpft. Die Kultur wurde mittels einer Membranpumpe durch eine Glasfritte (Schott, G 1) unter sterilen Bedingungen bei 30°C stark belüftet. Nach 14-stündiger Züchtung hatte die Kultur das letzte Drittel der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Die Zelldichte wurde nephelometrisch (Photometer Elko III, C.Zeiss, Oberkochem) kontrolliert.

Tabelle 2

Vollmedium

Bacto Yeast Extract	1,0 g
Bact Beef Extract	4,0 g
Casein-Pepton (trypt. gespalten)	4,0 g
NaCl	2,5 g
Glucose	10,0 g
Aq. bidest ad	1000 ml

Die Lösung wird auf pH 7,4 eingestellt und 15 Minuten bei 1,5 atm autoklaviert. Hierbei sinkt der pH-Wert gewöhnlich auf 7,1 .

2.2.1.3 Züchtung im Fermenter

Zur Gewinnung größerer Zellmengen wurde ein Fermenter ("Fermenter Kiel", L.Eschweiler und Co., Kiel) eingesetzt. Bei einem Kulturvolumen von 7 l Vollmedium wurden 400 ml einer stationären Vorkultur (24 Stunden Züchtung, s.o.) als Inokulat verwendet. Die Züchtung erfolgte bei konstanter Belüftung und konstantem pH (pH-Stat). Das Wachstum wurde durch ein eingebautes Photometer kontinuierlich gemessen und registriert; zusätzliche Kontrollen der Zelldichte erfolgten durch Bestimmung der Zelltrockenmasse.

2.2.2 Puffer

Folgende Puffer wurden verwendet:

1) 50 mM KH_2PO_4 Na_2HPO_4
2) 50 mM MES-Tris
3) 50 mM Glycylglycin
4) 25 mM Tris-HCl
5) 25 mM MOPS
6) 100 mM Tris-Acetat
7) 25 mM Tris-Na-K-Phosphatpuffer

Sofern nicht anders vermerkt, wurde 50 mM MES-Trispuffer (pH 7,1) benutzt.

2.2.3 Herstellung der Zellsuspension

Die Zellen der Hauptkultur wurden durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 3500 x g und 12°C) geerntet, zweimal mit Aqua bidest und anschließend einmal mit Puffer (s.u.) gewaschen. Da die Zellen während des Wachstums zur Ausbildung mycelartiger Aggregate neigen, war es erforderlich, sie 2-3mal für 5 Sekunden mit einem Ultra-Turrax Homogenisator zu behandeln. Dabei werden die Zellen nur in unbedeutendem Ausmaß zerstört, die Myzelien hingegen zerschlagen.

Die Einstellung der Zellsuspension auf die gewünschte Dichte erfolgte an Hand einer Eichkurve nephelometrisch mittels der Trübungsmeßeinrichtung zum Photometer Elko III (C.Zeiss). Die Zelltrockengewichte wurden gravimetrisch bestimmt: 4 ml Zellsuspension wurden durch gewichtskonstant getrocknete und gewogene Membranfilter Vakuum-filtriert und mit 4 ml Aqua bidest nachgespült. Die Filter mit dem Zellfilm wurden dann in einem

Exsikkator über Silicagel über Nacht getrocknet und gewogen; das Zelltrockengewicht ergibt sich aus der Gewichtsdifferenz.

Etwas anders war das Vorgehen bei Untersuchungen der Zellen aus Fermenterkulturen. Zu den angegebenen Zeiten wurde dem Fermenter 50 - 200 ml Kulturlösung entnommen. Die Vorbereitung der Zellen richtete sich nach der Fragestellung.
a) Für die Bestimmung des Membranpotentials wurden Zellen unmittelbar nach der Entnahme aus dem Fermenter über Membranfilter vom Medium getrennt, zweimal mit 10 ml MES-Tris-Puffer auf dem Filter gewaschen und im gleichen Puffer unter Zuhilfenahme eines Potter-Homogenisators mit Teflon-Stempel auf eine Dichte von 1 mg Trockenmasse ml^{-1} suspendiert.
b) Zur Messung der intrazellulären Adeninnucleotidspiegel wurden die Zellen, 2 - 12 ml, wie unter a) beschrieben abfiltriert, mit 0,1 M KCl auf dem Filter zweimal gewaschen und sofort anschließend mit Hilfe der Tris-HCl-Methode extrahiert. Der Vorgang nahm bis zum Beginn der Extraktion nicht mehr als 40 Sekunden in Anspruch.
c) Für die Bestimmung der Transportkapazitäten wurden die Zellen nach Membranfiltration zunächst zweimal mit 10 ml 0,1M KCl gewaschen und erst danach in Puffer (MES-Tris, bzw. Phosphatpuffer) suspendiert. Nach den Befunden von LangHeinrich (1972) wird auf diese Weise der Verlust der Aminosäuren aus dem zellulären Pool während der Waschprozedur weitgehend verhindert.

2.2.4 Bestimmung der Transportraten

2.2.4.1 Inkubation der Ansätze

Als Reaktionsgefäße wurden 25 ml-Erlenmeyerkölbchen mit Seitenarm verwendet. Zellen (3 ml im Hauptraum) und radioaktiv mar-

kierte Substrate (50 - 200µl im Seitenarm) wurden vor Start der Reaktion in einem Schüttelwasserbad (110 OpM) auf 30°C temperiert. Danach wurden Zellen und Substrate miteinander gemischt. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 2 ml Suspension entnommen und die Zellen durch Membranfiltration abgetrennt. Das Filtrat wurde aufgefangen und zur Bestimmung der extrazellulären Radioaktivitätsmenge verwendet. Filter und Zellen wurden mit 2 ml einer auf 30°C vorgewärmten Pufferlösung nachgewaschen und anschließend in ein Zählgefäß mit 13 ml der in Tab.3 beschriebenen Scintillatorlösung übertragen.

Tabelle 3

Scintillationslösung

Dimethyl-POPOP	
(1,4-bis-2-(-4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)Benzol)	50 mg
PPO (2,5 Diphenoloxazol)	3 mg
Toluol	1000 ml
Ethanol	600 ml
Methanol	300 ml

Da bei allen Versuchsanordnungen dieser Art stets ein geringer, häufig aber nicht zu vernachlässigender Anteil an radioaktivem Material durch die Filtermatrix gebunden wird und auch durch nachfolgendes Waschen mit Puffer nicht entfernt werden kann, wurden in jedem Experiment Filterleerwerte bestimmt. Hierzu wurden zellfreie Lösungen mit dem gleichen Gehalt an Radioaktivität wie in den Versuchsansätzen vorhanden , in gleichen Aliquots über Membranfilter abfiltriert. Die Filter wurden in der üblichen Prozedur mit Puffer nachgewaschen und anschließend zur Radioaktivitätsmessung verwendet. Zur Bestimmung der Radioaktivitätsmenge der Inkubationslösungen wurden je 0,2 ml der Filtrate verwendet. Als Meßgerät zur Bestimmung der Radioaktivitätsmengen diente ein "Tricarb"-Scintillationszähler.

2.2.4.2 Berechnung der Ergebnisse der Transportexperimente

Aus den Impulsraten wurden folgende Werte berechnet:

Zelluläre Radioaktivität (nach Abzug des Filterleerwertes):

u'_c = IpM/g Zelltrockenmasse

Radioaktivität der Inkubationslösung

a'_f = IpM/ml Medium

Relative Aufnahme der Radioaktivität (Verteilungsquotient) zwischen intra- und extrazellulärem Kompartiment:

$$Ru' = \frac{u'_f}{a'_f}$$

Absolute Substrataufnahme pro Zeiteinheit

$V = Ru' \cdot a_f$ = µMole/g·Min

a_f = extrazelluläre Substratkonzentration (mM)

2.2.5 Extraktion der Adeninnuleotide

Für die Extraktion der intrazellulären Adeninnucleotide sind verschiedene Methoden beschrieben worden. Hiervon wurden folgende vergleichend untersucht:

1) DMSO-Methode (Du Pont Instruments 1978)
2) H_2SO_4-Methode (Forrest und Walker 1965)
3) Butanol- und Octanol-Methode (Du Pont Instuments 1978)
4) Perchlorsäure-Methode (Strange et al., 1963)
5) Tris-HCl-Methode (Holm-Hansen und Both 1966)

DMSO-Methode

0,1 ml Zellsuspension (1 mg Zelltrockenmasse/ml) wurde mit 0,9 ml einer täglich neu bereiteten 90%igen DMSO-Lösung vermischt und 15 Sekunden mit einem Vortex Mixer behandelt. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, 5 ml MOPS-Puffer (25 mM, pH 7,4) zugefügt und gut vermischt. Die Lösung wurde bis zur Weiterverwendung im Eisbad gelagert.

H_2SO_4-Methode

9 ml Zellsuspension wurden in 1 ml 6N H_2SO_4, die auf 0^oC vorgekühlt war, pipettiert. Nach 5 Minuten wurden die Proben dem Eisbad entnommen und 20 Minuten bei Zimmertemperatur belassen. Anschließend wurden sie mit 6N NaOH auf pH 7,4 gebracht. Während der Neutralisierung wurde die Lösung im Eisbad gehalten, um die Reaktionswärme abzuführen. Die Proben wurden dann 5 Minuten bei 2000 UpM und 0^oC zentrifugiert, und die Überstände für die Messungen eingesetzt.

Butanol-Octanol-Methode

Zu 1 ml Zellsuspension wurde 1 ml Butanol und 0,1 ml 0,1M MOPS-Puffer zugesetzt. Nach 15 Sekunden Mischen (Vortex- Mixer) wurden 8 ml Octanol zugegeben; das Gemisch wurde 10 Sekunden geschüttelt; anschließend wurden die Zellen 3 Minuten bei 0^oC 3000 UpM abzentrifugiert. Die obere, organische Phase des Lösungsmittels wurde abgesaugt und verworfen. Von der wässrigen Phase wurden 3 ml für die Messungen entnommen.

Perchlorsäure-Methode

Zu 3 ml Zellsuspension wurden 0,6ml einer 35%igen, auf 0^oC vorgekühlten Perchlorsäure zugesetzt, gut gemischt, und 30 Minuten im Eisbad belassen. Die Suspension wurde dann 5 Minuten bei 0^oC

und 2000 UpM zentrifugiert. Vom Überstand wurden 2 ml entnommen und der pH-Wert mit einer Lösung von 2,4M KOH und 0,53M $KHCO_3$ auf 7,5 eingestellt. Diese Lösung wurde mit 25mM Tris-HCl 5-fach verdünnt; der Niederschlag aus $KClO_4$ wurde durch zentrifugieren entfernt.

Tris-HCl-Methode

1ml Zellen wurden zu 6ml kochendem Tris-HCl-Puffer (25mM, pH 7,4) gegeben und 5 Minuten bei 100°C gehalten. Anschließend wurden die Proben im Eisbad abgekühlt, 5 Minuten dort belassen und dann 5 Minuten bei 2000 UpM und 4°C zentrifugiert. Für Versuche mit unterschiedlichen Puffern, verschiedenen Substraten und Hemmstoffen wurden Zellen (3 - 5ml) durch Membranfilter filtriert, mit gleichem Volumen Puffer nachgewaschen, der Membranfilter mit den Zellen in ein geschlossenens Reagenzglas mit 7ml kochendem Tris-HCl übertragen und wie oben beschrieben weiter verarbeitet.

Für die vergleichenden Untersuchungen über die Einsetzbarkeit der einzelnen Techniken zur Extraktion der Adeninnucleotide bei S.hydrogenans wurden jeweils Doppelproben angesetzt: Eine Meßserie enthielt nur die Zellsuspension, eine zweite zusätzlich ATP, ADP resp. AMP als interne Standards zur Bestimmung der Verlustrate bei der Aufarbeitung. Hinsichtlich weiterer Details wird auf Abschnitt 3.1 verwiesen.

2.2.6 Bestimmung der Adeninnucleotide in Zellextrakten

Als Methode zur Messung der zellulären ATP-, ADP- und AMP-Spiegel wurde die Luciferin-Luciferase-Methode (Firefly-Methode) benutzt. Die Reaktion läuft nach folgendem Schema ab:

(1) $$\text{ATP + Luciferin - Luciferase} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{AMP-Luciferin - Luciferase + PP}$$

(2) $$\text{AMP-Luciferin - Luciferase + } O_2 \longrightarrow \text{Photon + } CO_2 \text{+ Oxiluciferin-Luciferase + AMP}$$

Die Messung der Photonenemmision erfolgte bei 562nm mit dem Biolumineszenzgerät XP-2000 (SKAN, Schweiz).

Wie das Reaktionsschema zeigt, läßt sich mit dieser Methode ATP direkt messen; Zur Bestimmung von ADP und AMP sind Hilfsreaktionen notwendig, mit denen diese Nucleotide in ATP umgewandelt werden (s.u.). Besonders ist darauf zu achten, daß alle Messungen bei gleicher Ionenstärke vorgenommen werden, da das Firefly-system stark von der Ionenstärke abhängig ist. Als Enzympräparat wurde zunächst der Firefly-Extrakt von Serva, Heidelberg, verwendet. Dabei handelt es sich um ein Rohpräparat, welches nicht mit Luciferin gesättigt war. Aus diesem Grunde wurde jeder Präparation reines Luciferin im Überschuß zugesetzt. Nach dem Auflösen des Präparates in bidest. Wasser war zunächst eine 30-minütige Inkubation bei Zimmertemperatur erforderlich, um das im Rohextrakt vorhandene ATP abbauen zu lassen. Erst danach konnte das Enzym zur Messung eingesetzt werden. Später wurde ausschließlich das hochgereinigte Testsystem von Boehringer Mannheim eingesetzt. Die Testansätze enthielten 500 µl der unten angegebenen Extraktgemische, 200µl Luciferin-Luciferase und 500µl Tris-HCl, 25mM, pH 7,4 . Die Mischung erfolgte durch eine automatische Dosiervorrichtung, die auch das Signal zum Beginn der Messung auslöste. 15 Sekunden nach Beginn wurde die Messung gestoppt, und die Summe der Impulse auf dem Meßgerät digital angezeigt. Die Auswertung erfolgte anhand von Eichmessungen, die für jeden Versuchstag neu durchgeführt werden mußten.

Bestimmung von ATP

1ml Zellextrakt
200µl Puffer 1
50µl $(NH_4)_2SO_4$ (pH 7,4 , 3,2M mit 7,5mg Rinderserumalbumin/ml)

Zusammensetzung von Puffer 1: 25mM Tris-HCl, pH 7,4 mit 9mM Phosphoenolpyruvat, 330mM $MgSO_4$ und 1,22M KCl

Bestimmung von ADP

1ml Zellextrakt
200µl Puffer 1
25µl $(NH_4)_2SO_4$ (pH 7,4 , mit 10mg Rinderserumalbumin/ml)
25µl Pyruvatkinase (10mg Enzym/ml 3,2M $(NH_4)_2SO_4$; das Präparat enthielt ca. 200U/mg)

Bestimmung von AMP

1ml Zellextrakt
200µl Puffer 1
25µl Pyruvatkinase (wie oben)
25µl Myokinase (5mg Enzyme/ml 3,2M $(NH_4)_2SO_4$; das Präparat enthielt ca. 360U/mg)

Die Ansätze zur Bestimmung des ATP-, ADP- und AMP-Gehaltes wurden einheitlich bei 28°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Proben 5 Min. im kochenden Wasserbad inkubiert, um die Hilfsenzyme zu inaktivieren. Andernfalls reagiert nach Zusatz des Luciferin-Luciferase-Systems das aus ATP gebildete AMP wieder zu ATP und täuscht einen zu hohen ATP-Gehalt vor. Nach der Hitzebehandlung werden die Proben im Eisbad abgekühlt.

Enzympräparation der Firma Serva, Heidelberg: Extract aus 50mg lyophilisierten Leuchtkäferorganen wurden in 6ml bidest. Wasser gelöst.
Luciferin: 2mg Luciferin wurden in 10ml Tris-Acetat-Puffer (0,1M, pH 7,4) bei 0°C unter Lichtabschluß gelöst (braune Glasflasche, Eisbad). Diese Lösung war lichtgeschützt bei 4°C 8-10 Tage haltbar.

10µl dieser Lösung wurden zu 6ml Luciferaselösung zugesetzt. Die Endkonzentration an Luciferin betrug 2µg/6ml.

Enzympräparation der Firma Boehringer Mannheim: Das lyophilisierte, hochgereinigte Enzym (spezifische Aktivität 8mU/mg Protein) wurde in 6ml eiskaltem Tris-Puffer (0,5M, pH 7,4) gelöst. Eingefroren war das Präparat monatelang haltbar. Ein "Batch" reichte für 3000 Bestimmungen.

Luciferin: 5mg Luciferin wurden in 10ml Tris-Acetat-Puffer (0,1M, pH 7,4) gelöst.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 0,1ml Luciferase-Lösung 70µl Luciferin-Lösung zugesetzt und das Volumen mit Tris-Puffer (25mM, pH 7,4) auf 10ml ergänzt. Die Endkonzentration an Luciferin betrug 35µg/10ml.

Berechnung der Ergebnisse

Die Meßergebnisse werden angegeben als:

1) nMole ATP, ADP und AMP pro mg Zelltrockenmasse
2) Adenylate Energy Charge (AEC) nach Atkinson (1968)

$$AEC = 0{,}5 \frac{[ADP] + 2[ATP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]}$$

Dieser Ausdruck gibt den "Energetisierungsgrad" der Zellen an. Wenn alle Adeninnucleotide als ATP vorliegen, ist das Adenylatsystem maximal "geladen"; AEC ist dann eins. Im anderen Extremfall liegen alle Adeninnucleotide als AMP vor. Das System ist in diesem Zustand "ungeladen" und AEC ist gleich null. Liegen alle Adeninnucleotide als ADP oder aequimolare Mischung von ATP und AMP vor, ist das System zur Hälfte gesättigt; AEC ist dann 0,5.

2.2.7 Membranpotentialbestimmung

Zur Bestimmung des Membranpotentials wurden zwei Methoden benutzt:

1) Bestimmung der Verteilung von ^{3}H-Tetraphenylphosphoniumchlorid ($^{3}H\text{-}TPP^{+}$)

2) Messung der Verteilung von $^{86}Rb^{+}$ in Anwesenheit von Nonactin.

Die experimentelle Vorgehensweise wird in Abschnitt 3.2 beschrieben.

2.2.8 Bestimmung der pH-Änderung im Außenmedium

Die Zellen wurden wie üblich geerntet. Nach dreimaligem Waschen in bidestilliertem Wasser wurden sie in 0,5mM MES-Tris-Puffer, pH 6,1 aufgenommen; diese Suspension wurde dann mit einem Ultra-Turrax zweimal hintereinander je 5 Sekunden behandelt und anschließend auf eine Konzentration von 3-5mg TG/ml eingestellt. Die Einstellung der Zellkonzentration erfolgte photometrisch; die Zellmasse wurde nachträglich gravimetrisch bestimmt. Nach Einstellung der Zellkonzentration wurden 20ml Zellsuspension in eine wassertemperierte, verschließbare Küvette (Abb. 1) pipettiert

und 0,2ml 0,1M Jodessigsäure zugesetzt. Die Suspension wurde dann mit 99,996%igem Stickstoff begast. Die pH-Messung erfolgte mittels einer Glaselektrode und eines pH-Meters der Fa. Radiometer, Kopenhagen, Modell pHM 64. Die pH-Änderungen wurden als Funktion der Zeit mit einem Servographschreiber registriert. Die pH-Elektrode war in der Küvette fixiert. Die Küvette hatte eine verschließbare Öffnung zum Entweichen von N_2, und eine mit Gummistopfen verschlossene Öffnung für die Injektion von Reagentien. Durch die gleiche Öffnung wurden Proben ohne O_2-Zutritt aus der Küvette entnommen. Vor der Injektion wurden die jeweiligen Lösungen und die verwendete Glasspritze für mindestens 10 Minuten unter N_2 begast. Die Übertragung der Lösungen erfolgte unter streng anaeroben Bedingungen. Für die Einstellung des pH-Wertes in der Küvette wurden 10mM HCl und 10mM NaOH benutzt. NaOH,HCl und Aminosäuren wurden, wie schon beschrieben, mit N_2 vorbegast. Zur Entfernung von O_2 aus FCCP-Lösungen und anderen, in Aethanol gelösten Substanzen, wurde der N_2-Strom zuvor mit Aethanol gesättigt.Vor Beginn des Experimentes wurden die Zellen für 30Minuten mit N_2 unter Rühren und konstanter Temperatur bei 30^0C begast. Danach wurden 0,2ml von der Aminosäure (1-5mM Endkonzentration) nach Begasung mit N_2 unter streng anaeroben Bedingungen in die Küvette eingespritzt. Die anschließende pH-Änderung wurde mit Hilfe des Schreibers verfolgt.

Entnehmen von Reagentien aus der Küvette

Eine Spritze, die an der Seite eine kleine Öffnung hatte, wurde durch das mit einem Gummistopfen verschlossene Loch in die Küvette eingeführt. Die Öffnung der Spritze befand sich oben, so daß bei zurückgezogenem Kolben das Spritzenvolumen mit N_2 durchströmt wurde. Durch Absenken der Spritze in die Lösung war es nun möglich, Proben sauerstofffrei zu entnehmen. Diese wurden

anschließend mittels einer Spezialvorrichtung sauerstofffrei, in Anwesenheit von N_2, vakuumfiltriert. Anschließend wurden die Zellen mit N_2-vorbegastem Puffer nachgewaschen. Der Radioaktivitätsgehalt von Zellen und Medium wurde dann in der üblichen Weise bestimmt.

Berechnung der Ergebnisse

A = µmole H^+, die benötigt werden, um den extrazellulären pH-Wert um 0,1 Einheiten zu verändern

B = ml Zellsuspension in der Küvette

D = Änderung des extrazellulären pH nach Zusetzen einer Aminosäure

Tg = Trockengewicht in g/ml

$$\frac{\frac{A}{B} \cdot 10^4 \cdot D}{Tg} \cdot 1000 = E$$

$$\frac{E}{V} = \text{Stöchiometrie}$$

E = µmole H^+/g Trockenzellen

V = µmole aufgenommene Aminosäure/g Trockenzellen

3 Methodische Vorarbeiten

3.1 Optimierung der Adeninnucleotidbestimmung

3.1.1 Vergleich verschiedener Extraktionsverfahren

In Abschnitt 2.2.5 sind verschiedene, in der Literatur beschriebene Extraktionsverfahren aufgeführt, die hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit für die Bestimmung der Adeninnucleotidspiegel und der AEC bei S.hydrogenans miteinander verglichen wurden.

Die Ergebnisse sind in Tab.4a zusammengefasst. Nach den Daten liefert die Tris-HCl-Methode die höchsten Werte für die Spiegel der energiereichen Nucleotide (ATP, ADP) und auch die höchste AEC; die Schwankungsbreite ist am geringsten. Die Extraktion mit DMSO ist wegen der Beeinflussung des Detektionssystems durch das Lösungsmittel, zumindest was die Bestimmung von ADP und AMP betrifft, nicht zuverlässig.

3.1.2 Einfluß der Zellmenge auf das Extraktionsergebnis

Vergleichende Messungen zeigten, daß mit dem hier benutzten Detektionssystem Linearität zwischen dem Adeninnucleotidgehalt und der Zellmenge im Bereich von 1 und 5mg Zellmasse pro 7ml Extraktionspuffer erzielt wird.

Wie in Abb.2 dargestellt, wurde eine lineare Steigerung der Meßwerte auch beobachtet, wenn zu einer definierten Zellmenge vor der Extraktion steigende Mengen ATP zugesetzt wurden (interner Standard). Wenn umgekehrt zu einer konstanten ATP-Menge steigende Mengen an Zellen (1 - 5mg/ml) zugegeben wurden, war die ATP-Ausbeute ebenfalls linear von der eingesetzten Zellmenge abhängig. Hieraus folgt, daß das Detektionssystem durch Zellbestandteile nicht beeinflußt wird.

Tabelle 4a: Adeninnucleotidgehalt bestimmt durch verschiedene Extraktionsmethoden.

Methode	ATP nMol/mg TG	ADP nMol/mg TG	AMP nMol/mg TG	AEC
	Mittelwert ±SD	MIttelwert ±SD	MIttelwert±SD	
DMSO	8,79±0,265	**	**	
H_2SO_4	8,64±0,34	2,19±0,12	1,3 ± 0,17	0,80
Butanol Ocatnol	8,01±0,41	2,12±0,146	1,64±0,172	0,77
Perchlor-säure	8,7 ±0,32	2,2 ±0,115	1,2 ±0,12	0,809
Tris-HCl	8,8 ±0,2	2,29±0,104	1,14±0,11	0.81

** : Starke Schwankungen der Werte; daher nicht verwertbar.

Mittelwerte von 11 Extraktionen

SD : Standardabweichung

AEC : Adenylat energy charge

Dabei erscheint Tris-HCl-Puffer geeigneter als Extraktions-Puffer die Phosphat enthalten (Abb.3) weil er einen höheren ATP- und ADP-Gehalt leifert.

3.1.3 Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Adeninnucleotid-spiegel

Zellen aus der späten exponentiellen Phase wurden in Glucose-haltigem Phosphatpuffer bei 0°C, 12°C und 30°C unter Schütteln inkubiert und zu bestimmten Zeiten auf ihren Adeninnucleotid-gehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.4 zusammengefaßt.

Die ATP-Spiegel nahmen bei 0°C unerwartet stark und rasch ab, während sie bei 12°C, resp. 30°C deutlich anstiegen. Die rasche Abnahme bei 0°C ist wahrscheinlich auf eine, durch Abkühlen induzierte Erhöhung der Membranpermeabilität (Ring, 1965) zurück-zuführen.

Auch die ADP-Spiegel wurden durch Abkühlen auf 0°C vermindert, wenn auch mit einer gewissen Verzögerung. Bei 12°C, resp. 30°C, war, wie im Falle des ATP, eine deutliche Erhöhung der Kon-zentrationen zu verzeichnen.

Der AMP-Gehalt war bei 30°C am niedrigsten; die Zeitkurve ver-hält sich tendenziell spiegelbildlich zu den ADP- und ATP-Kurven, was physiologisch verständlich ist.

Der Gesamtgehalt an Adeninnucleotiden (AXP) nahm bei 30°C und 12°C innerhalb von 20 Minuten um ca. 34% zu, bei 0°C um 61%ab.

Die AEC lag bei 30°C und 12°C in etwa auf gleicher Höhe und erreichte nach 20 Minuten den Maximalwert von 0,82; bei Inku-bation bei 0°C sank sie auf 0,59 herab.

Diese Daten zeigen, daß die Spiegel der Adeninnucleotide und die AEC stark von der Inkubationstemperatur abhängen. Bei den folgenden Experimenten wurde einheitlich eine Temperatur von 30°C gewählt.

Um eine Vergleich der hier gewonnenen Meßwerte für die AEC mit Daten aus anderen Untersuchungen zu ermöglichen, wurden in Tab. 4b Werte aus der Literatur zusammengestellt. Danach liegt bei S.hydrogenans die AEC im oberen Bereich der bisher beschriebenen Daten.

Organismen	Bedingungen	AEC	Literatur
Aerobacter aerogens	stationäre Phase		Strange et al, 1963
	aerob	0,57	
	anaerob	0,35	
Klebsiella aerogens	pO_2, 2,5 mm Hg	0,82	Butlin et al., 1971
	0	0,65	
Azotobacter vinelandii	exponentielle Phase	0,83	Liao u.Atkinson, 1971
Methanobacterium	maximale CH_4-Produktion	0,67	Robertson u. Wolfe, 1970
Escherichia coli	Aerob, exponentielle Phase	0,92	Franzen u. Binkly, 1961
Rhodospirillum rubrum	Dunkel,aerob	0,72	Schön, 1969
	Dunkel, anaerob	0,45	
Saccharomyces cerevisiae	anaerob	0,47	Kopperschläger et al.,1967
	aerob	0,64	
Trichomonas foetus	anaerob	0,9	Cerkasovovà , 1970
	aerob	0,83	
Chromatium D	Dunkel, anaerob	0,78	Gibson u. Morita, 1967
	Licht, anaerob	0,91	
Bacillus megaterium	vegetative Zellen	0,79	Setlow u. Kronberg, 1970
	Sporen	0,09	
Bacillus cereus	Sporen	0,08	Setlow und Kronberg,1970

Tabelle 4 b Adenylat Energy Charge (AEC) bei verschiedenen Mikroorganismen

3.2 Messung des Membranpotentials

3.2.1 Allgemeines

Für die Bestimmung des Membranpotentials kann die Gleichgewichtsverteilung von solchen Ionen benutzt werden, die passiv transportiert werden, und die keine Fluß-Kopplung an andere aktiv transportierte Substanzen besitzen. Nachdem sich diese Ionen zwischen Cytosol und Extrazellulärflüssigkeit im Gleichgewicht verteilt haben, gilt folgende Beziehung zwischen den intra- und extrazellulären Konzentrationen (Geck, 1976):

$$a_i/a_o = \xi^z = \exp(-z \cdot F \cdot \psi / R \cdot T)$$

a_i; a_o : intra- und extrazelluläre Aktivitäten
z : Ladungszahl
F : Faraday-Konstante
T : absolute Temperatur
ξ : elektrochemischer Aktivitätskoeffizient
ψ : Membranpotential
R : Gaskontante

Darum kann die Gleichgewichtsverteilung für die Messung des Membranpotentials angewendet werden.

Auch wenn im Prinzip alle Ionen, die durch die Membran nicht aktiv transportiert werden, zur Bestimmung des Membranpotentials benutzt werden können, müssen aus experimentellen Gründen weitere Bedingungen erfüllt werden:
1) Die Ionen sollen möglichst schnell durch die Membran diffundieren.

2) Die Transporteigenschaften der Zelle sollen dabei nicht beeinflußt werden.
3) In der benutzten Konzentration sollen sie nicht toxisch sein.
4) Die Ionen sollen nicht metabolisierbar sein.
5) Sie sollen weder an Membranen noch an intrazellulären Molekülen adsorbiert werden.
6) Die Gleichgewichtseinstellung soll reversibel sein.
7) Bei anliegendem Membranpotential sollen sie in der Zelle angereichert werden.

Bis heute sind aber keine Ionen bekannt, die all diesen Ansprüchen gerecht werden. Jedoch ist es möglich, verschiedene Ionen mit gewissen Einschränkungen erfolgreich einzusetzen.

Im nächsten Abschnitt wird die Anwendbarkeit von einigen, oft benutzten Ionen diskutiert.

3.2.2 Möglichkeiten zur Bestimmung des Membranpotentials

Von den verschiedenen Ionen, die zur Membranpotentialbestimmung benutzt werden können, kommen bei S.hydrogenans nur Kationen in Frage, da die Zellen - wie viele andere Bakterien - innen negativ geladen sind. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Höhe der bei verschiedenen Einzellern gefundenen Membranpotentiale. In Abwesenheit von Substanzen, die selektiv die Gleichgewichtseinstellung eines bestimmten Kations beschleunigen, wie beispielsweise Valinomycin oder Nonactin, läßt sich das Membranpotential durch Messung der Verteilung von $^{42}K^+$, besser noch von $^{86}Rb^+$ relativ leicht bestimmen (Nicolls, 1974; Padan et al., 1976). Rb^+ verhält sich bezüglich seiner Verteilung zwischen Intra- und Extrazellularraum wie das physiologische K^+.

Zellspecies	Membran-potential (mV)	Bestimmungs-methode (s.u)	Literatur
Streptococcus faecalis	180	(1)	Bakker, 1978
" "	145	(2)	Bakker, 1978
" "	110	(3)	Bakker, 1978
Staphylococcus aureus	134	(4)	Collins u. Hamilton ,1976
Escherichia coli	140	(5)	Griniuviene et al., 1974
" "	137	(4)	Collins u. Hamilton, 1976
Chlorella vulgaris	130	(6)	Komor u. Tanner, 1976
Streptomyces hydrogenans	138	(6)	diese Arbeit

(1) : Verteilung von Tl^+

(2) : Fluoreszenzbestimmung mit 3,3-dihexyloxacarbocyanin

(3) : Verteilung von $MTTP^+$

(4) : Verteilung von K^+

(5) : Verteilung von $^{86}Rb^+$

(6) : Verteilung von TPP^+

Tabelle 5 Übersicht über das Membranpotential verschiedener Zellen

Der Vorteil gegenüber $^{42}K^+$ besteht in der längeren Halbwertzeit des Isotops $^{86}Rb^+$ (18,6 Tage gegenüber 12,5 Stunden). Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß durch das Ionophor u.U. der Energiestoffwechsel der Zelle, und damit indirekt auch der zelleinwärtsgerichtete Substrat-Transport beeinträchtigt wird. Anstelle von K^+ oder Rb^+ sind bei S. faecalis und E.coli (Bakker, 1978) auch Thallium-Ionen zur Bestimmung des Membranpotentials verwendet worden. Dies hat den Vorteil, daß die Zellmembran für Tl^+ so permeabel zu sein scheint, daß auf den Einsatz von Ionophoren verzichtet werden kann. Allerdings können Schwierigkeiten entstehen, wenn, wie bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, Tl^+ aktiv über die Membran transportiert wird (Sessler, 1983).

Anstelle von anorganischen Kationen werden häufig auch kleine, lipidlösliche organische Kationen, wie Tetraphenylphosphonium (TPP^+) und Methyltriphenylphosphonium ($MTTP^+$) eingesetzt (Geck 1976). Vor allem TPP^+ vermag wegen seines lipophilen Charakters die Zellmembran so rasch zu permeieren, daß die Gleichgewichtseinstellung innerhalb von Sekunden bis Minuten erfolgt. Bei genügend niedrigen Konzentrationen ist es nicht toxisch, so daß Energiestoffwechsel und aktive Transportvorgänge allenfalls gering beeinflußt werden. Da TPP^+ für diese Arbeit als ^3H-TPP^+ zur Verfügung stand, bot es sich an, seine Einsetzbarkeit zur Bestimmung des Membranpotentials bei S.hydrogenans zu prüfen.

3.2.3 Einfluß von TPP^+ auf die AIB-Aufnahme und die ATP-Spiegel bei S.hydrogenans

Um festzustellen, inwieweit TPP^+ den Aminosäuretransport bei S. hydrogenans beeinflußt, wurde die AIB-Aufnahme als Funktion

der Außenkonzentration von TPP^+ untersucht. Das Ergebnis ist in Abb.5 dargestellt. Unterhalb von 10µM TPP^+ wird die AIB-Aufnahme nicht beeinflußt. Bei überschreiten dieser Konzentration wird der Transport jedoch rasch gehemmt; die Hemmung ist bei ca. 50µM halbmaximal. Demgegenüber ist die Wirkung auf die ATP-Spiegel der Zellen deutlich geringer (Abb.6). Die Schwellenkonzentration, oberhalb derer die ATP-Spiegel abnehmen, liegt bei 200µM.

3.2.4 Untersuchungen zur Aufnahme von ^3H-TPP^+

Da für die Aufnahmeversuche in dieser Arbeit die Membranfiltertechnik zur Abtrennung der Zellen vom Inkubationsmedium eingesetzt wurde, war zu prüfen, ob ^3H-TPP^+ von Filtermaterial in nennenswertem Ausmaß gebunden wird, und hieraus Verfälschungen der Meßwerte entstehen können. Aus diesem Grund wurden Membranfilter verschiedener Hersteller auf ihr Adsorptionsvermögen für TPP^+ überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 und Abb.7 zusammengestellt. Sie zeigen, daß die Filtermaterialien von Millipore (Zellulose-nitrat und -acetat) und Sartorius (Zellulosenitrat) so hohe Bindungskapazitäten für ^3H-TPP^+ haben, daß sie für die geplanten Untersuchungen nicht verwendbar sind. Dagegen erwies sich das Adsorptionsvermögen der Polycarbonatfilter ("Unipore") von Biorad als so gering, so daß diese für die weiteren Messungen eingesetzt werden konnten. Daneben ist allerdings zu berücksichtigen, daß auch die Stützgitter der Filtergeräte für die Membranfilter eine substantielle Bindungskapazität für TPP^+ haben (Abb. 7, obere Hälfte).

Tabelle 6 : Adsorption von ^{3}H-TPP^{+} durch Membranfilter verschiedener Hersteller.

Membranfilter der Firma	Prozent Adsorption durch Membranfilter	
	^{3}H-TPP^{+}-Konzentration (4,33 mCi/mMol)	
	10 µM	20 µM
Sartorius (Zellulose Nitrat)	60	55
Millipore (Gemisch aus Zellulose-Acetat und -Nitrat)	45	32
BioRad (Polycarbonat, unipore)	3	1,9

Die Zahlen geben an, welcher Anteil der Radioaktivität durch Membranfilter adsorbiert wurde. Die Radioaktivität der ^{3}H-TPP^{+}-Lösung vor der Filtration durch die Membranfilter wurde als 100% eingesetzt. Filtrationsmenge 2 ml; Puffer: MES-Tris 50 mM, pH 7,1.

3.2.5 Abhängigkeit der TPP^+-Aufnahme von der Zeit und vom Inkubationspuffer

Abbildung 8 zeigt den zeitlichen Verlauf der TPP^+-Aufnahme bei einer Außenkonzentration von $10x10^{-6}M$, einer Konzentration, bei der weder der Aminosäuretransport gehemmt wird, noch die ATP-Spiegel vermindert werden. Die Aufnahme wurde vergleichend in MES-Tris-Puffer (50mM, pH 7,1) und in K-Na-PO_4-Puffer (50mM, pH 7,1) gemessen. Wie Abb. 8 zeigt, beträgt die Halbwertzeit der Gleichgewichtseinstellung in K-Na-Phosphatpuffer eine Minute, in MES-Tris-Puffer zwei Minuten. Die Ergebnisse zeigen ferner deutlich, daß die Aufnahme von ^3H-TPP^+ in MES-Tris-Puffer, welcher kein K^+ enthält, höher ist als in K-Na-Phosphatpuffer, Dementsprechend unterscheiden sich auch die aus diesen Daten berechneten Membranpotentiale: Bei Inkubation in MES-Tris-Puffer betrug das Membranpotential -198mV, bei Inkubation in Phosphatpuffer - 153mV (ohne Korrektur für die Adsorption von ^3H-TPP^+).

3.2.6 Eichung der Membranpotentialbestimmung mit TPP^+ durch Messung der $^{86}Rb^+$-Verteilung in Gegenwart von Nonactin

Zur Bestimmung des Membranpotentials mit Hilfe eines lipidlöslichen Kations ist es notwendig, die Adsorption des Kations an zelluläres Material zu berücksichtigen. Näherungsweise ist diese proportional der Innenkonzentration des Kations und dem Trockengewicht. Die gesamte zelluläre Kationkonzentration wird dann durch die nachstehende Formel zu Ausdruck gebracht (Geck, 1976):

$$c_i^t = c_i^f \cdot (1 + a/w)$$

c_i^t ; c_i^f : Gesamtkonzentration und Konzentration des freien Kations im Zellinneren

a : Adsorptionskonstante

w : Wassergehalt der Zelle

Für die Bestimmung der Adsorptionskonstante a ist es nötig, den Verteilungsquotienten unter Konditionen zu messen, bei denen das Membranpotential bekannt ist. Unter Bedingungen, bei denen keine eletrogenen Pumpen arbeiten, z.B. bei gehemmtem Stoffwechsel, stellt sich ein reines Diffusionspotential ein. Es setzt sich zusammen aus den Konzentrationen aller anwesenden Ionen auf beiden Seiten der Membran und deren Beweglichkeit in der Membran.

Fließt kein elektrischer Strom durch die Membran, dann können die Elektrodiffusionsgleichungen der verschiedenen Ionen nach dem elektrochemischen Aktivitätskoeffizient ξ aufgelöst werden (Geck,1976):

$$\xi = \exp(-F \cdot \Psi / R \cdot T) = \frac{\sum z_i \cdot p_i'' \cdot c_i'' - \sum z_j \cdot p_j' \cdot c_j'}{\sum z_i \cdot p_i' \cdot c_i' - \sum z_j \cdot p_j'' \cdot c_j''}$$

z_i; z_j : Ladungszahlen der Kationen i und Anionen j

p_i; p_j : Permeabilitätskoeffizienten der Kationen i und Anionen j

c_i' ; c_i'' : Konzentrationen der Kationen i im Extrazellulärraum und im Zellinneren

c_j' ; c_j'' : Konzentrationen der Anionen j im Extrazellulärraum und im Zellinneren

F : Faraday-Konstante

R : Gaskonstante

T : absolute Temperatur

ξ : elektrochemischer Aktivitätskoeffizient

Ψ : Membranpotential

In einem biologischen System ist es jedoch sehr schwer, alle Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran und die Permeabilitätskoeffizienten hinreichend genau zu messen. Die Anwendung dieser Gleichung wird deshalb auf den Spezialfall beschränkt, daß das Produkt $p \cdot c$ einer bestimmten Ionenart wesentlich größer ist als das aller anderen Ionenarten. Das Membranpotential wird denn durch Bestimmung der Verteilung dieser Ionenart ermittelt. Für ein Kation gilt folgende Formel:

$$\xi = \exp(-F \cdot \varphi / R \cdot T) = (m'' + f'')/(m' + f')$$

m'; m'' : Außen- und Innenkonzentration des am besten permeablen Kations

f'; f'' : Korrekturterme für den Beitrag der übrigen Ionen zum Membranpotential

Die übrigen Symbole sind die gleichen wie in Gleichung (siehe oben)

Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn die Permeabilität für K^+ durch Nonactin selektiv erhöht worden ist. Bei ausreichend hoher Konzentration an K^+ auf beiden Seiten der Membran wird das Membranpotential lediglich von der K^+-Verteilung bestimmt. Bei geringeren K^+-Konzentrationen müssen außerdem die Korekturterme f' und f" berücksichtigt werden.

Zur Bestimmung der Korrektur für die intrazelluläre Adsorption von TPP^+ wurde die Verteilung von $^3H\text{-}TPP^+$ und $^{86}Rb^+$ (in Anwesenheit von Nonactin) bestimmt. Das Membranpotential wurde durch Zusetzen steigender Mengen an K^+ in Anwesenheit von Nonactin verändert und die Verteilung von $^3H\text{-}TPP^+$ und Rb^+ gemessen. Die Ergebnisse zeigt Abb.9. Danach besteht zwischen

der Verteilung von TPP^+ und Rb^+ eine lineare Korrelation. Die Gerade verläuft jedoch nicht durch den Nullpunkt, sondern schneidet die Ordinate oberhalb hiervon. Dies zeigt, daß ein Teil des TPP^+ potentialunabhängig von den Zellen gebunden wird.

Korrigiert man die Meßwerte nach der folgenden Beziehung

$$\Psi_k = \Psi_g + 60{,}149\ (\log WG + \log A)\ \text{in mV}$$

Ψ_k : Membranpotential korrigiert
Ψ_g : Membranpotential gemessen
WG : Wassergehalt der Zelle
log A = 0,42

$$60{,}149 = \frac{RT}{nF} \quad \text{bei } 30^\circ C$$

so erhält man für S. hydrogenans ein korrigiertes Membranpotential von 138 ± 10 mV (S.D., n = 12). Dies gilt für Zellen, die direkt nach Gewinnung und Suspendieren in MES-Tris-Puffer untersucht wurden. Zieht man den Korrekturfaktor von der TPP^+-Verteilung ab und trägt die auf diese Weise korrigierte TPP^+-Verteilung gegen die Rb^+-Verteilung auf, so erhält man eine Gerade, die durch den Nullpunkt geht. Ihre Steigerung beträgt 1,17; dieser Wert ist nicht signifikant von 1 verschieden.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluß der Wachstumsphase auf AIB-Transport und Adeninnucleotidspiegel

Wachstum: Abb.10 zeigt die Wachstumskurve einer Fermenterkultur von S.hydrogenans bei konstant gehaltenem pH und konstanter O_2-Zufuhr. Ungefähr 2 Stunden nach Versuchsbeginn hatten die Zellen die exponentielle Vermehrungsphase erreicht; nach weiteren 2,5 Stunden verlangsamte sich das Wachstum kontinuierlich, und nach 7 - 8 Stunden wurde schließlich die stationäre Phase erreicht. Zur Vereinfachung der Nomenklatur sollen im Folgenden die Wachstumsphasen als Phasen I - IV bezeichnet werden.

Transport: Wie Abb.10 zeigt, verändert sich die Transportkapazität der Zellen für AIB signifikant mit dem Wachstum der Zellen. Gleichzeitig mit Erreichen der Phase II beginnt die Transportkapazität anzusteigen; sie erreicht ihr Maximum am Ende der Phase II, fällt danach steil ab, durchläuft ein Minimum und erreicht während der Phase IV ungefähr wieder den Ausgangswert (Beginn der Phase I). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von LangHeinrich und Ring (1976) beschrieben.

Adeninnucleotide: Die Veränderungen der Konzentrationen der drei Adeninnucleotide während des Wachstums zeigt Abb.11. Der ATP-Gehalt nimmt während der Phase I rasch und um ca. 60% ab, bleibt während der Phase II und auch noch zu Beginn der Phase III relativ konstant; nach dem ersten Drittel der Phase III ist ein Anstieg auf die initiale Konzentration festzustellen, die auch während der Phase IV aufrechterhalten bleibt.

Anders verhält sich der ADP-Gehalt. Ausgehend von einem sehr niedrigen Niveau (0,5nMol/mg) steigt er fortlaufend an, erreicht gegen Ende der Phase III seinen Höchstwert, um danach wieder leicht abzufallen. Verglichen mit dem Gehalt an ATP und ADP zeigt der AMP-Gehalt die geringsten Veränderungen. Betrachtet man die Summe der Konzentrationen der drei Adeninnucleotide (AXP), so sieht man eine starke Modulation während des Wachstums; besonders auffällig sind der initiale Abfall und die darauf folgende starke Zunahme, die zu einem Maximum gegen Ende der Phase III führt. Danach fallen die Werte kontinuierlich wieder ab. Die Adenyl-Energy-Charge (AEC) fällt während der Phase I kontinuierlich um etwa 30%, bleibt danach bis zur Mitte der Phase III in etwa konstant und steigt danach geringfügig an. Ähnliche Verlaufskurven wurden bei anderen Mikroorganismen gefunden (Chapman et al., 1971; Wiebe und Bancroft, 1975).

Obwohl sich die Spiegel der Adeninnucleotide während des Wachstums der Kultur mehr oder weniger stark ändern, und auch die AEC eine charakteristische Fluktuation zeigt, läßt sich in keinem Fall eine Korrelation mit der Veränderung der Transportkapazität der Zellen für AIB feststellen. Dies könnte den Schluß zulassen, daß Adeninnucleotide oder AEC den AIB-Transport energetisch nicht versorgen, oder daß der Transport unter diesen Bedingungen nicht energielimitiert ist; letzteres würde bedeuten, daß die Transportrate durch die Carrierkonzentration in der Membran bestimmt wird.

4.2 Einfluß der Inkubationsbedingungen auf die Transportkapazität für AIB, den Adeninnucleotidgehalt und die AEC bei Zellen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase

Transport: Zellen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase (Phase III) verändern ihre Transportkapazität für AIB, wenn sie in Stickstoff-freiem Puffer bei 30°C inkubiert werden. Größe und Richtung der Veränderung sind von der Pufferzusammensetzung abhängig

Abb. 12 zeigt, daß der AIB-Influx um mehr als 400% zunimmt, wenn die Zellen in Phosphatpuffer in Gegenwart von 1% Glucose inkubiert werden. Bei Ersatz des Phosphatpuffers durch MES-Tris ist der Anstieg geringer. Fortlassen der Glucose führt zu einer weiteren Verminderung der Transportsteigerung.

Außer Glucose vermögen auch andere Kohlenstoffquellen den AIB-Transport zu stimulieren (Abb.13, Abb.14). Hierzu gehören Mannose, Fructose, Glycerol , weniger ausgeprägt auch Adenosin und Succinat. Dagegen verursachen Na-Butyrat, 2-Deoxiglucose und NH_4Cl gegenüber den Zusatz-freien Kontrollen eine Verminderung der Transportsteigerung. Beachtenswert ist weiterhin der außerordentlich starke Effekt von L-Glutamat, der bereits früher beschrieben und als "Transstimulierung" des Transportes erklärt worden ist (Groß et al., 1970).

In allen Fällen mit Ausnahme von Na-Butyrat war eine längere Inkubation für die Entwicklung der Wirkung auf den Transport erforderlich.

Wie Tabelle 8 zeigt, verändert sich der pH-Wert der Ansätze während 40-minütiger Inkubation in Gegenwart der verschiedenen

Substrat	AIB-Influx	AEC	ATP	ADP	AMP	AXP	Membranpotential
Glucose	175	83,3	57,4	66,6	50,0	54,7	111,9
Fructose	156	94,8	86,8	123,3	98,8	90,9	106,9
Mannose	168	79,5	62,6	66,6	90,0	65,7	110,7
Glycerol	154	93,2	58,2	65,4	20,0	69,4	106,5
L-Glutamat	289	82,0	57,1	101,0	90,5	71,0	105,9
Adenosin	142	103,8	95,6	116,6	45,5	86,7	108,2
Succinat	132	84,3	68,1	66,6	120,0	89,1	83,5
Na-n-Butyrat	65,5	94,3	92,3	69,9	95,5	84,3	83,5
NH_4Cl	86,0	70,9	88,5	69,9	79,4	79,7	80,7
NH_4Cl + 1% Glucose	53,0	64,8	81,6	66,2	78,5	77,5	84,2
DOG	98,5	62,5	4,6	16,6	30,0	14,6	124,5
D-Glutamat	107,2	-	-	-	-	-	98,7

Tabelle 7 Einfluß verschiedener Substrate auf den AIB-Influx, die Adeninnucleotidspiegel und das Membranpotential. Die Werte sind relative Zahlenangaben und beziehen sich auf die über den gleichen Zeitraum inkubierten Kontrollansätze (100 %). Die Inkubationen erfolgten bei 30° C über 50 Minuten.

Zusätze unterschiedlich stark.

Substrat	pH	pH-Unterschied
Kontrolle	7,1	
Glucose	6,92	-0,18
Mannose	6,94	-0,16
Fructose	6,95	-0,15
L-Glutamat	7,23	+0,13
Glycerol	6,98	-0,12
Adenosin	7,1	0,0
Succinat	7,17	+0,07
Na-n-Butyrat	6,97	-0,13

Tabelle 8: Änderung des pH im Außenmedium nach 40-minütiger Inkubation mit veschiedenen Substraten

Es war daher zu prüfen, ob diese pH-Verschiebungen Anteil an den Änderungen der Transportkapazität haben. Zu diesem Zweck wurden in einer Serie von Experimenten die Zellen vor Messung ihrer Transportkapazität für AIB durch Membranfiltration von ihren Inkubationslösungen getrennt und in frischem Puffer resuspendiert. Die (hier nicht gesondert aufgeführten) Resultate zeigen eindeutig, daß die inkubationsabhängigen pH-Verschiebungen im Medium für den Transport unbedeutend waren.

Adeninnucleotide: In Tabelle 7 sind Adeninnucleotidspiegel und AEC nach Inkubation der Zellen mit den verschiedenen C-Quellen und Ammoniumchlorid zusammengestellt. Dabei werden die unter-

schiedlichen Einflüsse der verschiedenen Substrate auf die Spiegel der drei Adeninnucleotide, der Gesamtmenge an Adeninnucleotiden, und der AEC deutlich. Unerwartet war dabei zunächst die Beobachtung, daß trotz der guten Verwertbarkeit der meisten Substrate als C-Quelle die ATP-Spiegel während der Inkubation deutlich absanken und auch die Summe der Adeninnucleotide abnahm. Außer Adenosin verursachten alle Substrate daneben eine deutliche Verminderung der AEC.

Die Zeitabhängigkeit der Veränderungen sind in Abb.15 und Abb.16 zusammengefaßt. Dabei zeigt sich, daß die aus Tabelle 7 zu entnehmenden Verminderungen der einzelnen Meßwerte gegenüber den Kontrollen in erster Linie daraus resultieren, daß der in den Kontrollansätzen zu verzeichnende Anstieg aller drei Adeninnucleotide und der AEC während der ersten 30 Minuten durch die einzelnen Zusätze unterschiedlich stark behindert wurde. Außer in Gegenwart von NH_4Cl sanken in keinem Fall die Werte unter die Ausgangswerte ab. Versucht man, die Ergebnisse der Transportmessungen mit denen der Adeninnucleotidbestimmungen zu korrelieren, finden sich keine Anhaltspunkte für unmittelbare Beziehungen.

4.3 Einfluß der Hemmung der Proteinsyntheses auf die Transportkapazität, den Adeninnucleotidgehalt und die AEC

Wie Abb. 17 zeigt, nimmt die Transportkapazität von Zellen aus der Phase IV für AIB nach Zugabe von 0,1mg Chloramphenicol/ml Zellsuspension nach vorübergehender Steigerung kontinuierlich ab, während der Transport in Abwesenheit des Hemmstoffes stark ansteigt. Dieser Effekt entspricht früheren Beobachtungen (Groß und Ring, 1969). In Abb.18 ist gezeigt, daß die eingesetzte Hemmstoffmenge ausreicht, den Einbau von ^{14}C-Leucin in Perchlorsäure-unlösliches Material vollständig zu unterbinden. Nach 30minütiger Inkubation mit Chloramphenicol sind die Spiegel von ATP, ADP (Abb. 19) und AXP um 21,7%, 13,2% bzw. 9,9% angestiegen; der AMP-Gehalt ist hingegen um 33,3% vermindert. Die AEC steigt um 7,6%. Zwischen Transportkapazität und "Energetisierungsgrad" der Zellen scheint daher auch unter diesen experimentellen Bedingungen kein Zusammenhang zu bestehen.

In den folgenden Experimenten wurden Zellen aus der späten exponentiellen Phase in MES-Tris-Puffer in Gegenwart von 0,1mg CAP/ml inkubiert und der Einfluß der in den vorausgegangenen Experimenten eingesetzten, transport-stimulierenden, resp. transporthemmenden Substrate auf den AIB-Influx und den Adeninnucleotidgehalt untersucht.

Anders als bei den in Abb. 13 und 14 dargestellten Ergebnissen sind Hexosen, Glycerol und Adenosin in Gegenwart von Chloramphenicol nicht in der Lage, den AIB-Transport zu stimulieren. Dies gilt auch für L-Glutamat, den wirksamsten Transportstimulator in ungehemmten Zellen (Abb.20). Eher ist eine geringfügig inhibierende Wirkung festzustellen, die auch bei Succinat, Butyrat und NH_4Cl vorhanden ist.

Der Einfluß von CAP auf den Adeninnucleotidgehalt und die AEC ist in Tabelle 9 zusammengefaßt. Dabei zeigt sich, daß unter Einfluß des Hemmstoffes die ATP-Spiegel in Gegenwart aller Zusätze gesenkt werden, teilweise um mehr als 50%. Aber auch die Summe der Adeninnucleotide nimmt ab, so daß der Effekt auf die AEC, sieht man von dem Wert für Mannose ab, nur relativ gering ist.

	AEC	ATP	AXP	Membran-potential	Ru'
Glucose	90,0	48,6	65,1	117,9	104,0
Fructose	89,9	86,6	82,6	103,6	103,0
Mannose	76,5	61,2	67,7	110,9	101,0
Glycerol	101,0	76,0	75,0	105,8	101,0
L-Glutamat	93,0	49,8	60,3	115,9	91,0
Adenosin	82,6	79,9	89,3	109,3	101,0
Succinat	83,5	66,1	88,1	93,5	89,0
Na-n-Butyrat	93,6	91,3	83,6	89,6	85,0
NH_4Cl	96,6	86,5	76,7	88,9	88,0

Tabelle 9: Einfluß verschiedener Substrate auf die Konzentration der Adeninnucleotide, das Membranpotential und den AIB-Influx nach 50minütiger Inkubation der Zellen mit Chloramphenicol. Die Zahlenwerte sind prozentuale Angaben, bezogen auf die im gleichen Zeitraum (mit CAP) inkubierten Kontrollzellen.

Auch diese Gruppe von Experimenten läßt keine Zusammenhänge zwischen Transportaktivität und dem Gehalt an Adeninnucleotiden, resp. AEC, erkennen. Dies wurde durch (hier nicht darge-

stellte) Experimente bestätigt, in denen der Adeninnucleotidgehalt nach mehrminütiger Inkubation CAP-gehemmter Zellen mit AIB bestimmt wurde. Obwohl die AIB-Aufnahme Energie benötigt, konnten experimentell keine Veränderung der Adeninnucleotidspiegel und der AEC festgestllt werden.

Zusammengefaßt lassen diese Experimente daher nur den Schluß zu, daß der AIB-Transport entweder nicht durch die zellulären Adeninnucleotidspiegel limitiert wird, oder eine andere Form der Energiequelle benutzt wird.

4.4 Einfluß von Stoffwechselhemmstoffen auf AIB-Transport und Adeninnucleotidgehalt

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß verschiedener Stoffwechselinhibitoren auf den Influx von AIB und die zellulären Adeninnucleotidspiegel untersucht.

4.4.1 Oligomycin

Oligomycine sind neutrale, ungesättigte, optisch aktive Alkohole und Ketone. Sie hemmen die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP. Anders als die Hemmstoffe der Atmungskette üben sie jedoch keinen direkten Einfluß auf irgendeinen Elektronenüberträger der Atmungskette aus. Vielmehr wird der Vorgang der ATP-Bildung durch Hemmung der membrangebundenen ATP-Synthase unmittelbar blockiert. Den gleichen Effekt hat DCCD (Harold et al., 1969; Evans, 1970; Asghar et al., 1973; Kashket und Wilson, 1972).

Nach kurzfristiger Inkubation der Zellen mit verschiedenen Oligomycinkonzentrationen bis 10^{-4}M konnte keine Hemmung der AIB-Aufnahme gemessen werden. Bei 10^{-4}M war der AIB-Influx um 23% gegenüber der Inhibitor-freien Kontrolle erhöht. Die ATP-Spiegel waren um 14,6%, die AEC war um 9,6% angestiegen; die ADP- und AMP-Konzentrationen waren um 33%, resp. 19,8% vermindert.

4.4.2 Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD)

Wie bereits erwähnt, hat dieser Hemmstoff eine ähnliche Wirkung auf den Energiestoffwechsel wie Oligomycin. Abb.21 zeigt die Wirkung von DCCD bei Konzentrationen zwischen 10^{-4} und 10^{-3}M auf den AIB-Influx. Schon bei 10^{-4}M ist eine etwa 25%ige Hemmung des AIB-Influxes festzustellen; 10^{-3}M DCCD hemmt den Transport innerhalb von 15 Min. nach Zugabe des Hemmstoffes nahezu vollständig. Ähnlich starke Effekte sind auch an den Adeninnucleotidspiegeln festzustellen. Hier fällt jedoch auf, daß nicht nur die Spiegel der energiereichen Tri- und Dinucleotide absinken, sondern auch die AMP-Konzentration vermindert wird (Abb. 21 A). Dies ist der Grund, warum auch bei hoher DCCD-Konzentration die AEC nur vergleichsweise geringfügig abnimmt. Abnahme von Transportaktivität und ATP- (und ADP-) Spiegel korrellieren zwar miteinander, jedoch nicht Transport und AEC.

4.4.3 2-Desoxy-D-Glucose (DOG)

DOG wird wie Glucose in die Zellen transportiert und dort zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert. Weitere Metabolisierung ist aber nicht möglich, so daß bei DOG-Überschuß das zelluläre ATP verbraucht wird, ohne daß durch Substratkettenphosphorylierung

und oxidative Phosphorylierung ATP neu gewonnen werden kann.

Tabelle 7 zeigt, daß bei 45-minütiger Inkubation der Zellen mit 1% DOG der AIB-Influx nur geringfügig abnimmt; deutlich - nämlich um rund 40% - ist hingegen die AEC vermindert, während das Membranpotential (s.u.) um etwa 25% zunimmt.

4.4.4 KCN

KCN blockiert die Elektronenübertragung von Cytochrom a/a_3 auf Sauerstoff und damit die Atmungskette. Nach Zugabe zu den Zellen hemmt es innerhalb weniger Minuten die AIB-Aufnahme (Abb. 22). Die Hemmung ist maximal bei einer Konzentration von $5x10^{-3}$M; bei 10^{-3}M beträgt die Hemmung ca. 66%. Bis zu dieser Konzentration bleiben (innerhalb einer Inkubationszeit von 15 Minuten) die Adeninnucleotidspiegel und die AEC unbeeinflußt. Erst bei $4x10^{-3}$M KCN ist eine geringfügige Verminderung der AEC zu beobachten.

Wie die in Abschnitt 4.3 aufgeführten Ergebnisse zeigen, lassen die vorstehenden Daten keinen Zusammenhang zwischen der Transportkapazität der Zellen für AIB und der AEC oder der Konzentration der drei Adeninnucleotide erkennen. Demnach muß angenommen werden, daß der AIB-Transport nicht durch die zellulären Adeninnucleotidspiegel limitiert wird, oder aber eine andere Form von Energie benutzt wird.

4.5 Membranpotential und AIB-Transport

Triebkraft für die Aufnahme vieler Substrate ist das Membranpotential (Zusammenfassung bei Booth und Hamilton, 1980). Es war daher zu prüfen, ob bei S.hydrogenans ein Zusammenhang mit der Transportkapazität für AIB und der Größe des Membranpotentials vorhanden ist. Das Membranpotential wurde anhand der TPP^+-Verteilung bestimmt (s.Abschnitt 3.2).

4.5.1 Membranpotential und AIB-Transport in wachsenden Zellen

Abb. 23 zeigt das Membranpotential der Zellen bei Isolierung aus der wachsenden Kultur und nach Suspension in MES-Tris-Puffer. Die Werte stimmen nicht miteinander überein, was seine Ursache in der unterschiedlichen Zusammensetzung des äußeren Milieus haben mag. Bei den unmittelbar aus der Kulturlösung entnommenen Zellen nimmt das Membranpotential nach Start der Kultur zunächst rasch, dann verlangsamt ab, erreicht während der Phase II sein Minimum und steigt dann allmählich wieder an. Nach Inkubation der Zellen in Puffer ergibt sich eine hierzu fast spiegelbildliche Kurve.

Unbeschadet dieser, bisher ungeklärten Differenz zeigt die Abbildung, daß zwischen AIB-Transportkapazität und Membranpotential keine positive Korrelation, die auch die quantitativen Unterschiede in der AIB-Aufnahme erklären könnte, besteht. Da von Fritsch (1982) Hinweise erbracht worden sind, daß an der Energetisierung des Transportes von AIB und L-Glutamat bei S.hydrogenans das Membranpotential zumindest beteiligt ist, zeigen die in Abb.23 dargestellten Ergebnisse, daß die Ursache der Modulation der Transportkapazität während des Kulturwachstums nur eine Veränderung der Carrierkonzentration sein kann,

nicht aber Veränderungen im Energiehaushalt der Zellen.

4.5.2 Membranpotential und AIB-Transport in nicht-wachsenden Zellen; Einfluß von Substraten und Chloramphenicol

In den Abbildungen 13 und 14 ist dargestellt worden, daß während der Inkubation von Zellen aus der späten exponentiellen Phase (III) die Transportkapazität für AIB erheblich zunimmt und die Zunahme durch verschiedene Substrate in unterschiedlicher Weise beeinflußt werden kann. In den Abbildungen 24 und 25 ist gezeigt, wie sich während dieser Inkubation das Membranpotential verändert. In den Kontrollansätzen nimmt das Membranpotential langsam und fast kontinuierlich ab, während der AIB-Transport zunimmt (Abb.13, Abb. 14). Zusatz der meisten Substrate führt ebenfalls zu einer mehr oder weniger deutlichen Abnahme des Membranpotentials, darunter auch bei L-Glutamat, welches den AIB-Transport stark erhöht. Lediglich in Gegenwart von 2-Deoxiglucose nimmt das Membranpotential gegenüber dem Ausgangswert deutlich zu.

Vergleicht man Transportkapazität und Membranpotential für jeden Einzelansatz miteinander, so findet sich in keinem Fall eine positive Korrelation. Zur gleichen Schlußfolgerung führen entsprechende Experimente, die in Gegenwart von Chloramphenicol durchgeführt wurden (nicht dargestellt). Hierbei zeigte sich, daß bei Inkubation der Zellen mit Chloramphenicol das Membranpotential über 50 Minuten geringfügig zunahm, während die AIB-Aufnahme sich verminderte. Die Zunahme des Membranpotentials und von Adeninnucleotiden nach Zugabe von Chloramphenicol mag darauf beruhen, daß mit Hemmung der Proteinsynthese (und hierdurch ausgelöste Hemmung der Synthese von Nucleinsäuren) die

wichtigsten energieverbrauchenden Prozesse blockiert sind und die Zelle in eine Situation temporärer Überversorgung gerät.

4.5.3 Membranpotential und Hemmstoffe des Energiestoffwechsels

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluß von Hemmstoffen, die die Durchlässigkeit der Zellmembran für bestimmte Ionen selektiv erhöhen und somit das Membranpotential verändern können, auf die TPP^+-Verteilung und den AIB-Influx untersucht.

4.5.3.1 Carbonylcyanid-p-trifluormethoxiphenylhydrazon (FCCP)

FCCP ist eine selektiver Protonenkonduktor und wirkt daher auf Mitochondrien und Bakterien entkoppelnd. Es beeinflußt beide Terme der "proton-motive-force " (PMF), da es zum Ausgleich des über der Membran liegenden Protonengradienten führt, gleichzeitig aber auch die intrazelluläre Kationenkonzentration verändert. Bei Mitochondrien vermindern $2x10^{-6}$M FCCP innerhalb von 2 Minuten die PMF von -210 auf -50mV (Nicholls und Bernson, 1977); in Chlorella vulgaris vermindern 10^{-6}M FCCP das Membranpotential um 41,5% (Komor und Tanner, 1976).

In Tabelle 10 ist der Einfluß von FCCP auf S.hydrogenans zusammengefaßt. Die Zellen waren in 50mM MES-Tris-Puffer suspendiert und 30 Minuten bei 30^{o}C inkubiert worden, bevor FCCP in den angegebenen Konzentrationen zugeführt wurde. 5 Minuten später wurden diesen Suspensionen Aliquots entnommen und in der üblichen Weise der Transport von Aminosäuren, die TPP^+-Verteilung und der Adeninnucleotidgehalt bestimmt. Da Effekte auf die Adeninnucleotidspiegel und AEC innerhalb der kurzen Inkubationsphase nicht

nachweisbar waren (s. Asghar et al., 1973), wurden die Werte nicht in die Tabelle aufgenommen.

FCCP (M)	Membranpotential (in %)	Aminosäureaufnahme (in %)		
		Asp	Arg	AIB
0	100	100	100	100
$3{,}93\times10^{-7}$	66,3	93	73,4	71,5
$1{,}96\times10^{-6}$	55,5	23,2	35,8	36,3
$3{,}93\times10^{-6}$	47,4	9,3	20,5	15,5

Tabelle 10: Hemmung des Aminosäuretransportes und Verminderung des Membranpotentials durch FCCP.

Die Daten zeigen, daß bereits ca. $0{,}4\times10^{-6}$M FCCP die Aminosäureaufnahme deutlich hemmen. Gleichzeitig ist auch das Membranpotential erniedrigt. Bei ca. 4×10^{-6}M FCCP sind nur noch mäßige Restaktivitäten für den Transport von AIB und Arginin, und eine sehr niedrige Restaktivität für den Aspartat-Transport nachweisbar. Das Membranpotential ist um mehr als die Hälfte vermindert.

4.5.3.2 Nigericin

Nigericin katalysiert den stöchiometrischen Austausch von H^+ gegen K^+. Es bewirkt daher den Abbau des zelleinwärts gerichteten H^+-Gradienten, ohne gleichzeitig das Membranpotential zu beeinflussen (Asghar et al., 1973). Darin unterscheidet es sich von FCCP.

Nigericin (M)	Aminosäure	Aminosäure-aufnahme (in %)	Membran-potential (in %)
$5{,}94\ 10^{-8}$	AIB	58,9	111,1
	Asp	69,1	111,1
	Arg	100,0	111,1
$5{,}94\ 10^{-7}$	AIB	50,0	121,2
	Asp	15,1	"
	Arg	46,5	"
$5{,}94\ 10^{-6}$	AIB	6,8	94,6
	Asp	4,65	"
	Arg	10,5	"

Tabelle 11 Einfluß von Nigericin auf Aminosäuretransport und Membranpotential

Die Wirkung von Nigericin auf den Aminosäuretransport, das Membranpotential und die Adeninnucleotidspiegel bei S.hydrogenans ist in Tabelle 11 und Abb. 26 dargestellt. Bereits bei einer Konzentration von $5{,}9 \times 10^{-8}$M ist die Aufnahme von AIB und Aspartat stark gehemmt, während die Argininaufnahme noch unbeeinflußt ist. Steigerung der Nigericinkonzentration um 2 Größenordnungen führt bei allen drei Aminosäuren praktisch zur vollständigen Transporthemmung.

Bereits sehr niedrige Nigericin-Konzentrationen bewirken eine zwar nur geringe, nichtsdestoweniger aber signifikante Verminderung der ATP- und einen Anstieg der AMP-Spiegel. Die AEC sinkt geringfügig ab. Erst bei $5{,}9 \times 10^{-6}$M Nigericin ist die AEC um ca. 15% vermindert.

Das Membranpotential wird bis zu einer Nigericin-Konzentration von $5{,}9 \times 10^{-7}$M gesteigert; bei weiterer Erhöhung der Konzentration fällt es unter die Kontrollwerte ab.

Die Erhöhung des Membranpotentials bei niedrigen Nigericin-Konzentrationen läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß nicht nur ein aequimolarer Austausch von K^+ und H^+ durch die Membran stattfindet, sondern ein Teil der in die Zellen gelangten Protonen durch die membrangebundene, ATP-abhängige Protonenpumpe wieder nach außen transportiert wird. Da dieser Vorgang primär elektrogen ist, kann als Ergebnis eine Hyperpolarisierung der Membran erwartet werden. Der leichte Abfall der ATP- und der dementsprechende Anstieg der AMP-Spiegel bei niedrigen Nigericin-Konzentrationen wäre mit einer solchen Annahme vereinbar.

Der bei niedrigen Nigericin-Konzentrationen zu beobachtende starke Effekt auf den Influx von AIB und Aspartat (bei gleich-

zeitiger Steigerung des Membranpotentials) ist ein Hinweis dafür, daß die Aufnahme dieser Aminosäuren energetisch primär durch den zelleinwärts gerichteten H^+-Gradienten versorgt wird. Demgegenüber scheint die Aufnahme von Arginin eher das Membranpotential als den H^+-Gradienten als Energiequelle zu nutzen.

4.5.3.3 Nonactin

Nonactin ist ein Ionophor, welches, wie Valinomycin, selektiv die K^+-Permeabilität von Membranen erhöht (es wirkt sich daher primär nur auf das Membranpotential aus, ohne den Protonengradienten zu beeinflussen). Da Valinomycin bei S.hydrogenans unwirksam zu sein scheint, wurde für die folgenden Experimente an seiner Stelle Nonactin verwendet.

Bei Konzentrationen zwischen $1{,}3 \times 10^{-6}$ und $7{,}4 \times 10^{-5}$ M setzt Nonactin Membranpotential und AIB-Influx herab (Tabelle 12). Dieser Effekt ist von der Anwesenheit von K^+ abhängig.

Nonactin	AIB-Aufnahme	Membranpotential (in %)
0	100	100
$1{,}29 \times 10^{-6}$	93,8	91,8
$1{,}29 \times 10^{-5}$	58,4	82,5
$7{,}4 \times 10^{-5}$	30,5	75,6

Tabelle 12: Hemmung des AIB-Transportes und Verminderung des Membranpotentials durch Nonactin

Der Einfluß von Nonactin auf AIB- Transport und Adeninnucleotidspiegel (Messung nach Inkubation in Phosphatpuffer) ist in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt. Die Wirkung des Hemmstoffes ist fast momentan.Die starke Hemmung der AIB-Aufnahme wurde bereits erwähnt.Erstaunlich ist der starke Abfall der Adeninnucleotidspiegel, der jedoch auch an Mitochondrien beobachtet worden ist (Graven et al., 1966). Während die ATP- und AXP-Spiegel bei $7{,}4 \times 10^{-5}$M Nonactin um ca 40% gesenkt werden, wird die AEC nur um rund 12% herabgesetzt. Auf diese Weise wird die durch das Leckwerden der Membran bedingte Beeinträchtigung des Energetisierungsgrades der Zellen in Grenzen gehalten.

4.5.3.4 Inkubation unter Anaerobiose

Bei Inkubation der Zellen unter Luftabschluß (Begasung mit O_2-freiem N_2) in glucosehaltigem Phosphatpuffer wird die AIB-Aufnahme um 75% vermindert. Wie in Abb. 29 dargestellt, werden gleichzeitig die Adeninnucleotidspiegel stark (ATP um 65%), die AEC nur ca. 25% vermindert.

4.5.4 Abhängigkeit des Aminosäuretransportes von der Größe des Membranpotentials

Nachdem die im vorangegangenen Kapitel geschilderten Untersuchungen die Möglichkeit hatten erkennen lassen, daß die Aufnahme von AIB und anderen Aminosäuren von der Größe des Membranpotentials abhängt, wurde dieser Gesichtspunkt in den folgenden Experimenten weiter vertieft.

4.5.4.1 Veränderung des Membranpotentials durch Nonactin in Gegenwart von K^+

In dem in Abb. 30 dargestellten Versuch wurde das Membranpotential durch Zugabe unterschiedlicher Mengen von Nonactin bei konstanter extrazellulärer K^+-Konzentration verändert und anschließend der Influx von AIB gemessen. Die Abszisse zeigt das aufgrund der Verteilung von ^3H-TPP^+ gemessene Membranpotential, die Ordinate die Aufnahmeraten für ^{14}C-AIB. Wie man sieht, nimmt mit abnehmenden Membranpotential (induziert durch ansteigende Nonactinkonzentrationen) der AIB-Influx ab. Zwischen -100 und -150 mV ist der Transport linear vom Membranpotential abhängig.

Abb.31 stellt die Ergebnisse eines Experimentes zusammen, welches an Zellen durchgeführt wurde, deren Stoffwechsel durch Zusatz von KCN, Jodessigsäure und DCCD gehemmt worden war. Teil A der Abbildung zeigt den Abfall des Membranpotentials mit der Inkubationszeit bei Zellen ohne weiteren Zusatz und nach Zugabe von 12,9µM Nonactin. Teil B zeigt den zu verschiedenen Zeiten gemessenen Influx von AIB, Glutamat und Arginin. Dabei zeigt

sich erneut deutlich, daß mit abnehmendem Membranpotential auch die Aminosäureaufnahme vermindert wird. Dieses Experiment geht von der - durch die Meßwerte bestätigten - Annahme aus, daß die Zellen trotz der vollständigen Blockierung ihres Energiestoffwechsels noch über ein gewisses Membranpotential verfügen, welches durch Nonactin verändert werden kann. Ähnliche Experimente wurden von Asghar et al. (1973) und Niven und Hamilton (1974) beschrieben.

4.5.4.2 Veränderung des Membranpotentials durch Aminosäuretransport

Wenn das Membranpotential Triebkraft für die Anreicherung von Aminosäuren in der Zelle ist, sollte - zumindest in stoffwechselgehemmten Zellen - der transportbedingte Verbrauch dieser Energiequelle nachweisbar sein. Mißt man an ungehemmten Zellen das Membranpotential während der Inkubation mit transportierbaren Aminosäuren (Abb. 32), so ist in allen Fällen - wenn auch abgestuft - eine Erhöhung der Meßwerte, also eine Hyperpolarisierung festzustellen, unabhängig von der Meßmethode (Bestimmung der Verteilung von $^{3}H\text{-}TPP^{+}$ oder $^{86}Rb^{+}$).

Wurde dieses Experiment mit stoffwechselgehemmten Zellen wiederholt, so ergaben sich die in Abb. 33 dargestellten Beziehungen zwischen der Größe des Influxes der einzelnen Aminosäuren (Abszisse) und dem Membranpotential (Ordinate).

Hiernach nimmt das Membranpotential - bei blockierter Regenerationsfähigkeit - umso mehr ab, je größer die Transportrate der Aminosäure ist. Cycloleucin als relativ langsam aufgenommene (und gering akkumulierte) Aminosäure vermindert das Mem-

branpotential nur geringfügig; L-Arginin als stärker angereicherte Aminosäure hat einen entsprechend größeren Effekt.

Mit diesen Ergebnissen ist gezeigt, daß das Membranpotential als Triebkraft verschiedener Aminosäuren bei S.hydrogenans verwendet wird.

4.6 Protonenfluß und Aminosäuretransport

Wie von verschiedenen Autoren gezeigt worden ist (Zusammenfassung bei Booth und Hamilton, 1980), wird der Transport verschiedener Aminosäuren in Bakterien auch durch den Einstrom von H^+ aus dem Extrazellulärraum in das Plasma energetisch versorgt ("gekoppelter Transport"). Wie Abb. 34 zeigt, ist auch bei S.hydrogenans die Aufnahme von AIB mit einer Alkalisierung des Mediums gekoppelt. Nach Zugabe von 1mM AIB zu einer anoxisch gehaltenen, in 0,5mM Tris-Puffer bei $30^{o}C$ voraequilibrierten Zellsuspension stieg der pH-Wert innerhalb von 70 Sekunden um 0,03 ± 0,005, nach Zugabe von 1mM L-Glutamat um 0,018 ± 0,003 Einheiten. Für AIB betrug die Aufnahme in dieser Zeit 3,79 ± 0,05, für L-Glutamat 2,104 ± 0,032 Mole $min^{-1}g^{-1}$. Daraus läßt sich eine Stöchiometrie von 1,82, resp. 1,98 (aufgenommene Mole H^+ pro Mol AIB, resp. Glutamat) berechnen.

Diese Befunde weisen darauf hin, daß bei S.hydrogenans neben dem Membranpotential auch der zelleinwärts gerichtete Protonengradient Energiequelle für die Anreicherung bestimmter (neutraler und saurer, nicht hingegen basischer) Aminosäuren sein kann. Wieweit der H^+-Gradient die Anreicherung limitiert, kann aus diesen Messungen allerdings nicht abgeleitet werden.

5 Diskussion

Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche haben gezeigt, daß verschiedene Faktoren die Aufnahme von Aminosäuren bei S.hydrogenans beeinflussen. Dennoch läßt sich die eingangs gestellte Frage, ob der Transport neutraler Aminosäuren Carrier- oder Energie-limitiert ist , eindeutig beantworten.

Zunächst ist festzustellen, daß die Transportkapazität der Zellen für AIB offenbar von der Menge an Carriern, dem Membranpotential und dem zelleinwärts gerichteten H^+-Gradienten abhängt. Frühere Experimente haben gezeigt, daß der AIB-Transport auch durch negative und positive Feedbackregulatoren moduliert wird (Ring et al., 1970; LangHeinrich und Ring, 1976; Alim und Ring, 1976; Ring et al., 1977; Groß et al., 1970). Nicht abhängig ist der Transport hingegen von den zellulären Spiegeln von ATP, ADP und AMP und der AEC.

Um mögliche Korrelationen zwischen der Transportkapazität für AIB und den zellulären Adeninnucleotidspiegeln oder der AEC aufspüren zu können, waren verschiedenartige Versuchsbedingungen gewählt worden, von denen durch Voruntersuchungen bekannt war, daß sie starke Einflüsse auf die Aminosäureaufnahme haben: Messung des Transportes an wachsenden Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen; an nicht-wachsenden Zellen ("shift-down"-Bedingungen) in Gegenwart verschiedener, transportstimulierender Substanzen; Messung nach Inkubation der Zellen mit einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese und Hemmstoffen des Energiestoffwechsels.

In allen Experimenten dieser Gruppe konnten starke Modulationen der Transportkapazität für AIB festgestellt werden, und auch die

Spiegel der drei Adeninnucleotide waren starken Veränderungen unterworfen. In keinem Fall ließ sich jedoch die Veränderung der Transportkapazität mit der Konzentrationszunahme oder -abnahme eines der Adeninnucleotide korrelieren. Auch zwischen Transport und AEC ließ sich keine Beziehung finden. Daraus muß gefolgert werden, daß Adeninnucleotide nicht unmittelbar an der Energetisierung der aktiven AIB-Aufnahme beteiligt sind und den Transport daher nicht limitieren können. Andererseits ließen sich Beziehungen zwischen Adeninnucleotidspiegeln, AEC und dem physiologischen Zustand der Zellen finden, die plausibel sind und mit Beobachtungen an anderen Mikroorganismen übereinstimmen. Dazu gehören nicht nur die durch Hemmstoffe des Energiestoffwechsels ausgelösten Veränderungen, sondern auch die an wachsenden Zellen gemachten Beobachtungen sowie die Befunde an nicht-wachsenden Zellen, die in Gegenwart von Chloramphenicol inkubiert wurden. Die Daten, die im Detail hier nicht besprochen werden können, deuten darauf hin, daß zumindest physiologisch "junge" Zellen hinsichtlich ihrer Makromolekülsynthese durch die Adeninnucleotidspiegel limitiert sind. Beachtenswert ist ferner, daß die Zellen bestrebt sind, die AEC auch in den Situationen, in denen es zu einem starken Abfall der ATP-Spiegel kommt, möglichst lange hoch zu halten; dies gelingt durch kompensatorischen Abbau von AMP.

Auch die Experimente, die zur Klärung der Frage durchgeführt wurden, ob bei S.hydrogenans ein Zusammenhang zwischen AIB-Transport und Membranpotential als Triebkraft existiert, verliefen zunächst negativ. Erst an stoffwechselgehemmten Zellen konnte gezeigt werden, daß das Membranpotential als Triebkraft an der Aufnahme von AIB und anderen Aminosäuren beteiligt ist. Dieser Nachweis konnte auf zweierlei Weise geführt werden:

Durch Messung des Transportes bei variiertem Membranpotential, und durch Messung des Membranpotentials nach Inkubation der Zellen mit einer transportierbaren Aminosäure.

Entscheidend für das Auffinden der Korrelation zwischen Transport und Membranpotential war, daß der Energiestoffwechsel der Zellen vor Beginn der Messungen gehemmt wurde. Bei ungehemmten Zellen ist das Membranpotential offenbar groß genug, um den Transport von Aminosäuren mit maximalen Raten zu gewährleisten. Die Regeneration des "Verbrauchs" an Energie erfolgte so schnell, daß ein Transport-bedingter Abfall meß-technisch nicht nachgewiesen werden kann. Dies gelingt erst dann, wenn das Membranpotential weit genug abgesunken und eine Regeneration nicht möglich ist. Dies bedeutet aber nichts anderes, als daß unter normalen physiologischen Bedingungen der Transport von Aminosäuren, soweit das Membranpotential als Triebkraft beteiligt ist, energetisch überversorgt ist und erst bei Unterschreiten eines Schwellenwertes energielimitierend wird.

Außer dem Membranpotential ist bei vielen Mikroorganismen auch der zelleinwärts gerichtete H^+-Gradient als Triebkraft für den Transport von Aminosäuren und Zuckern beteiligt. Wie die in dieser Arbeit zuletzt beschriebene Versuchsserie zeigt, ist auch bei S.hydrogenans die Aufnahme von AIB und L-Glutamat mit der Aufnahme von Protonen verbunden. Zuvor hatten bereits Experimente mit Hemmstoffen, deren Wirkungsweise auf eine selektive Erhöhung der H^+-Leitfähigkeit der Membran beruht, starke Hinweise darauf erbracht, daß die Anreichung von AIB in den Zellen das Vorhandensein eines Protonengradienten voraussetzt. Nach den bisher erhobenen Befunden ist anzunehmen, daß beide Terme der PMF, also sowohl $\Delta\Psi$ als auch ΔpH , die AIB-Aufnahme energetisch versorgen. Welche Rolle den beiden Ener-

giequellen in verschiedenen physiologischen Zuständen zukommt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Zuvor müßte untersucht werden, wie groß Δ pH bei S.hydrogenans ist und welchen Modulationen es unterliegt.

Die mit dieser Arbeit gestellte Frage nach der Limitierung des AIB-Transportes kann auf der Basis der hier geschilderten Experimente so beantwortet werden, daß unter physiologischen Bedingungen der Transport energetisch ausreichend versorgt ist. Die Größe der Transportkapazität ist daher abhängig von der Menge an Carriermolekülen in der Membran; die Aktivität der Carrier scheint ausschließlich durch Feedbackinhibitoren und -stimulatoren gesteuert zu werden.

6 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob bei Streptomyces hydrogenans die aktive Aufnahme neutraler Aminosäuren durch die Carrier-Konzentration oder die Energiezufuhr limitiert wird. Ausgangspunkt für diese Fragestellung waren frühere Beobachtungen, wonach die Transportkapazität der Zellen für 2-Aminoisobuttersäure (AIB) während des Zellwachstums starken Veränderungen unterworfen ist, aber auch bei nichtwachsenden Zellen durch verschiedene Zusätze (Kohlenhydrate, bestimmte Aminosäuren) moduliert wird. Ferner war bekannt, daß Hemmstoffe der Synthese von RNS und Protein die Transportkapazität herabsetzen.

Als mögliche Energiequellen für den AIB-Transport wurden Adeninnucleotide (ATP, ADP, AMP), die Adenylate Energy Charge (AEC) und das Membranpotential untersucht. Die zellulären Adeninnucleotidspiegel wurden mit Hilfe des Luciferin-Luciferase-Systems bestimmt; das Membranpotential wurde aufgrund der Verteilung von ^{3}H-markiertem Tetraphenylphosphonium (TPP^{+}), resp. von $^{86}Rb^{+}$, errechnet.

Wachsende Zellen zeigen während der exponentiellen Vermehrungsphase eine stark erhöhte Aminosäureaufnahme. Die Änderungen der Transportkapazität ließen sich jedoch weder mit den während des Wachstums sich gleichfalls verändernden Adeninnucleotidspiegeln, noch mit der AEC oder dem Membranpotential in Zusammenhang bringen.

Bei Zellen aus der stationären Phase, die ohne N-Quelle in MES-Tris- oder Phosphatpuffer inkubiert werden, nimmt die Transportkapazität für AIB mit der Zeit stark zu. Die Zunahme wird noch

erhöht durch Zusatz von Hexosen oder Glutamat, während Butyrat, NH_4^+ oder 2-Deoxiglucose sich hemmend auswirken. Auch in diesen Fällen konnte keine Korrelation zwischen Transport und einer der möglichen Energiequellen gefunden werden. Gleiches gilt für Ansätze, bei denen die Zellen in Gegenwart von Chloramphenicol mit verschiedenen Hexosen, Glutamat oder NH_4^+ inkubiert worden waren.

Erst durch Einsatz von Hemmstoffen des Energiestoffwechsels (FCCP, KCN, Nigericin u.a.m.) gelang es nachzuweisen, daß die Triebkraft für den aktiven AIB-Transport in diesen Zellen das Membranpotential ist; unter Normalbedingungen, d.h. in ungehemmten Zellen, steht es als Energiequelle jedoch im Überschuß zur Verfügung, so daß kleinere Veränderungen sich nicht auf die Transportraten auswirken. Die Ergebnisse zeigen darüberhinaus, daß Adeninnucleotide und AEC als primäre Energiequellen für den AIB-Transport keine Rolle spielen. Dagegen konnte gezeigt werden, daß neben dem Membranpotential noch der zelleinwärts gerichtete H^+-Gradient an der Energetisierung des Aminosäuretransportes beteiligt ist.

Die eingangs gestellte Frage nach der Limitierung des Transportes kann daher mit der Feststellung beantwortet werden, daß unter physiologischen Bedingungen der Aminosäuretransport Carrier-limitiert ist.

7 Literaturverzeichnis

Alim,S und Ring,K. (1976). Regulation of amino acid transport in growing cells of Streptomyces hydrogenans. II. Correlation between transport capacity and growth rate in chemostat cultures. Arch. Microbiol. 111, 105-110.

Asghar,S.S., Levin,E. und Harold, F.M. (1973). Accumilation of neutral amino acids by Streptococcus faecalis. J.Biol.Chem. 215, 5225-5233.

Bakker, E.P. (1978). Accumulation of the Thallous ions (Tl^+) as a measure of the electrical potential difference across the cytoplasmic membrane of bacteria. Biochemistry J. 17, 2899-2904.

Berger, E.A. (1973). Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and Glutamine in E.coli. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 1514-1518.

Berger, E.A. und Heppel, L.A. (1974). Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of E.coli. J.Biol.Chem. 249, 7747-7755.

Booth, I.R. und Hamilton, W.A. (1980). Energetics of bacterial amino acid transport. In: Payne, J.W. (Herausg.): Microorganisms and Nitrogen Sources. John Willy, Chichester, New York S.171-206.

Butlin,J.D., Cox, J.B. und Gibson, F. (1971) Oxidative phosphorylation on E.coli. Biochem.J. 124, 75-81.

Cerkasovová,A. (1970). Energy producing metabolism of Trichomonas foetus. I. Evidence for control of intensy and the contribution of aerobiosis to the total energy production. Exp. Parasitol. 27, 165-178.

Chapman, A.G., Fall, L. und Atkinson, D.E. (1971). Adenylate energy charge in E.coli during growth and starvation. J.Bacteriol. 108,1072-1086.

Cockburn, M., Earnshaw, P. und Eddy, A.A. (1975). The stoichiometry of the absorption of protons with phosphate and L-Glutamate by yeasts of the genus Saccharomyces. Bioch.J. 146, 705-712.

Collins, S.H., Andrey, W.J., Raymond, J.L. und Hamilton, W.A. (1976). Proton movements coupled to Lactate and Alanine transport in E.coli : Isolation of mutants with altered stoichiometry in Alanine transport. J.Bacteriol. 126, 1232-1244.

Collins, S.H. und Hamilton, W.A.(1976). Magnitude of the proton motive force in respiring Staphylococcus aureus and E.coli. J.Bacteriol. 126, 1224-1231.

Cowell, J.L. (1974).Energetics of glycylglycine transport in E.coli. J.Bacteriol . 120, 139-146.

Curtis, S.J. (1974). Mechanism of energy coupling for transport of D-Ribose in E.coli . J.Bacteriol. 120, 295-303.

Du Pont Instruments (1978) Personliche Mitteilung

Eddy, A.A. und Nowacki, J.A. (1971). Stoichiometrical proton and potassium ion movements accompanying the absorption of amino acids by the yeast Saccharomyces carlsbergensis. Biochem. J. 122, 701-711.

Evans, D.J. (1970). Membrane Mg^{2+}-(Ca^{2+})- activated adenosine triphosphatase of E.coli. J.Bacteriol. 104, 1203-1212.

Forrest,W.W. (1969). ATPpool during the growth cycle in Streptococcus faecalis. J.Bacteriol. 90, 1013-1016.

Forrest,W.W. und Walker,D.J. (1965). Synthesis of reserve materials for endogenous metabolism in Streptococcus faecalis. J.Bacteriol. 89, 1448-1459.

Franzen, J.S. und Binkly, S.B. (1961). Comparison of the acid-soluble nucleotides in E.coli at different growth rates. J.Biol.Chem. 236, 515-519.

Fritsch,J.G. (1982) Regulierbarkeit und Energetisierung des Transportes saurer Aminosäuren bei Streptomyces hydrogenans. Dissertation Universität Frankfurt, Fachbereich 19.

Geck, P. (1976). Kurzzeitinkubationen und Membranpotentialbestimmungen zur Untersuchung der Kopplung zwischen Natriumionen und Aminosäuretransport bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen. Dissertation Universität Frankfurt, Fachbereich 15.

Gibson, J.und Morita,S. (1967). Changes in adenine nucleotides of intact Chromatium D produced by illumination. J.Bacteriol. 93, 1544-1550.

Graven, S.N. Lardy, H.A., Johnson, D. und Ruller, A. (1966). Antibiotics as tools for metabolic studies. Biochem. 5,1929.

Griniuviene,B., Chmieliauskaite, V. und Girinius, L.(1974). Energy linked transport of permanent ions in E.coli cells: Evidence for membrane potential generation by proton pump. Biochem.Biophys.Res.Commun. 56, 206-213.

Gross,W. und Ring, K. (1969). Effect of chloramphenicol on active amino acid transport. FEBS-Letters 4, 319-322.

Gross, W., Ring,K. und Heinz,E. (1970). Positive feedback regulation of amino acid transport in Streptomyces hydrogenans. Arch.Biochem.Biophys. 137, 253-261.

Harold,F.M., Baarda,J.R., Baron,C. und Abrams,A. (1969). Inhibition of membrane bound adenosine triphosphatase and of cation transport in Streptococcus faecalis by N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimide. J.Biol.Chem. 244, 2261-2268.

Holm-Hansen, O. und Booth,C.R. (1966). The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. Limnological Oceanography 11, 510-519.

Hotchkiss,R.D. (1944) Gramicidine, Tyrocidine and Tyrothricin. Advances in Enzymology 4, 153.

Kashket,E.R. und Wilson,T.H. (1972). Galactoside accumulation associated with ion movements in Streptococcus lactis. Biochem.Biophys.Res.Commun. 49, 615-620

Komor,E. und Tanner,W. (1976). The determination of the membrane-potential of Chlorella vulgaris. Eur.J.Biochem. 70, 197-204.

Kopperschläger,G., von Baehr,M.L., und Hofmann,E. (1967). Zur Regulation des mehrphasigen Verlaufes des aeroben und anaeroben Glucoseverbrauches in Hefezellen. Acta Biol.Med.Ger. 19, 691-704.

LangHeinrich,W. (1972). Untersuchungen über den Aminosäurepool und aktiven Aminosäuretransport bei Streptomyces hydrogenans. Dissertation; J.W.Goethe Universität, Frankfurt/M.

LangHeinrich,W. und Ring,K. (1976). Transport in growing cells of Streptomyces hydrogenans. Arch.Microbiol. 109, 227-235.

Liao, C.L. und Atkinson,D.E. (1971). Regulation at the phosphoenolpyruvate branch point in Azotobacter vinelandii: Pyruvate kinase. J.Bacteriol. 106, 37-44.

Lindner,F., Funk,R., Nesemann,G. und Schmidt Thome,J. (1958). Die Gewinnung von 20-Hydroxysteroiden aus 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden durch mikrobiologische Hydrierung mit Streptomyces hydrogenans. Hoppe-Seyler'sZ.Physiol.Chem. 313, 117-123.

Mitchell,P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol.Rev. 41, 445-502.

Nicholls,D.G. (1974). Hamster Brown-Adipose-Tissue mitochondria. The control of respiration and the proton electrochemical potential gradient by possible physiological effectors of the proton conductance of the inner membrane. Eur.J.Biochem. 49, 573-583.

Nicholls,D.G. und Bernson,V.S.M. (1977). Interrelationship between proton electrochemical gradient, Adenine-nucleotide phosphorylation potential and respiration during substrate level and oxidative phosphorylation by mitochondria from brown Adipose tissue of cold-adapted Guinea pigs. Eur.J.Biochem.75, 601-612.

Niven,D.F. und Hamilton,W.A. (1974). Mechanism of energy coupling to the transport of amino acids by Staphylococcus aureus. Eur.J.Biochem. 44, 517-522.

Padan,E., Zilberstein,D. und Rottenberg,H. (1976). The proton electrochemical gradient in E.coli cells. Eur J.Biochem. 63, 533-541.

Payne,J.W. (Ed.), (1980). Microorganisms and nitrogen sources. Department of Botany, University of Durham, U.K.

Rhoads,D.B. und Epstein,W. (1977). Energy coupling to net K^+ transport in E.coli K12. J.Biol.Chem. 252, 1394-1401.

Rhoads,D.B. und Epstein,W. (1978). Cation transport in E.coli. J.Gen.Physiol. 72, 283-295.

Ring,K. (1965). The effect of low temperatures on permeability in Streptomyces hydrogenans. Biochem.Biophys.Res.Comm. 19, 576-581.

Ring,K. (1969). Die Induktion des aktiven Transportes neutraler Aminosäuren bei Streptomyces hydrogenans. Biochim.Biophys.Acta 183, 375-393.

Ring,K., Foit,B. und Ehle, H. (1977). Stimulation of active uptake of 2-Aminoisobutyric acid in Streptomyces hydrogenans by exogenous dbc-AMP. Fems Microbiology Letters, 2, 27-30.

Ring,K., Gross,W. und Heinz,E. (1970). Negative feedback regulation of amino acid transport in Streptomyces hydrogenans. Arch.Biochem.Biophys. 137, 243-252.

Ring,K. und Heinz,E. (1966). Active amino acid transport in Streptomyces hydrogenans. Biochem.Z. 344, 446-461.

Roberton,A.M. und Wolfe,R.S. (1970). Adenosine triphosphate pools in Methanobacterium. J.Bacteriol. 102, 43-51.

Schön,G. (1969). Der Einfluß der Kulturbedingungen auf den ATP-, ADP- und AMP-Spiegel bei Rhodospirillum rubrum. Arch.Mikrobiol. 66, 348-364.

Sessler,M. (1983). Zellulärer Aufnahmemechanismus und klinische Anwendung von Thallium in der onkologischen Nuklearmedizin. Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Universität Frankfurt/M.

Setlow,P. und Kronberg,A. (1970). Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. XXII. Energy metabolism in early stages of germination of Bacillus megaterium spores. J.Biol.Chem. 245, 3637-3644.

Strange,R.E., Wade,H.E. und Dark,F.A. (1963). Effect of starvation on adenosine triphosphate concentration in Aerobacter aerogenes. Nature 199, 55-57.

West,I.C. und Mitchell,P. (1973). Stoichiometry of Lactose-protein symport across the plasma membrane of E.coli. Biochem.J. 132, 587-592.

Wiebe,J. und Bancroft,K. (1975). Use of the adenylate energy charge ratio to measure growth state of natural microbial communities. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72, 2112-2115.

Wilson,D.B. (1974). Source of energy for the E.coli Galactose transport systems induced by Galactose. J.Bacteriol. 120, 866-871.

8 Abbildungen

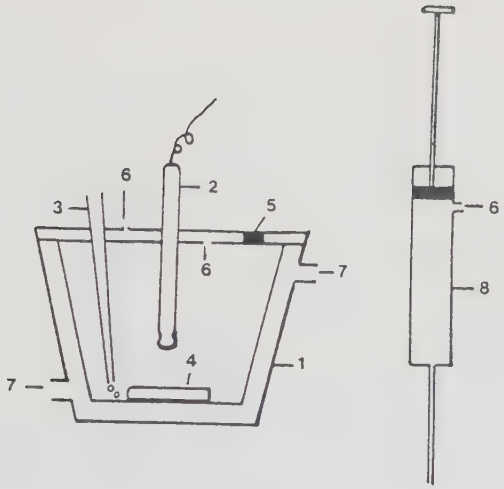


Abb. 1: Apparatur zur Bestimmung der pH-Änderung im Außenmedium

1. Thermostatisierbare Küvette
2. Elektrode
3. N_2-Begasung
4. Magnetkern
5. verschließbare Öffnung zur Aufnahme der Spritze
6. Gasaustrittsöffnung
7. Zuleitungen zum Thermostaten
8. Spritze

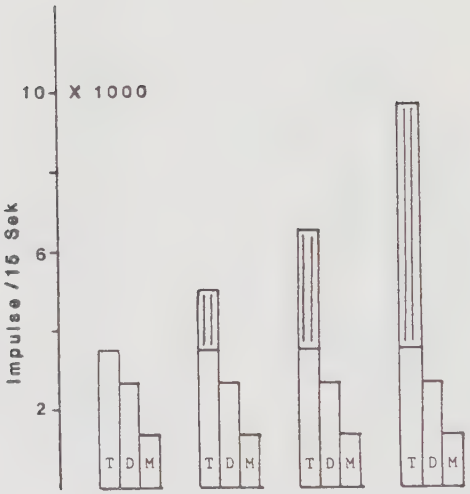


Abb.2: Bestimmung der Adeninnucleotidkonzentrationen in Zelllysaten mit und ohne Zusatz von ATP als externem Standard

T = ATP

D = ADP

M = AMP

□ = Adeninnucleotidgehalt des reinen Zellextraktes (Impulse/15sek.)

▥ = Impulsanteil des externen ATP-Standards

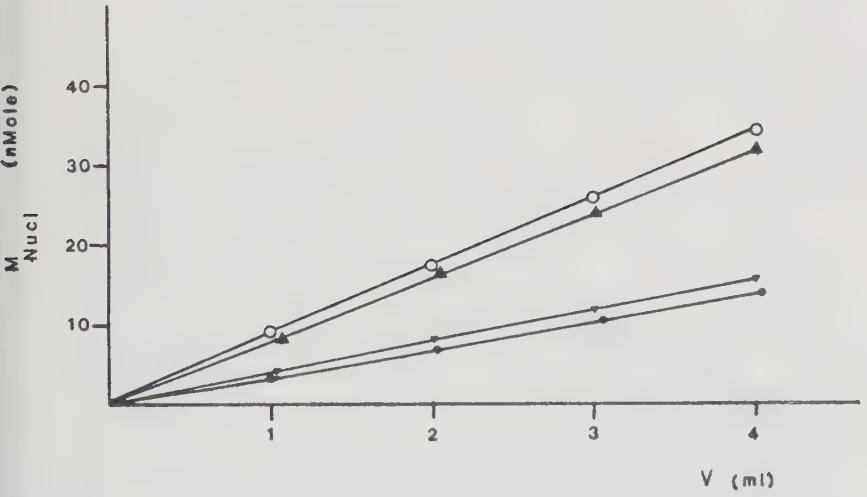


Abb. 3: Einfluß von Extraktionspuffer und Extraktmenge auf den zellulären ATP- und ADP-Gehalt

M_{Nucl}: Adeninnucleotidgehalt (n Mole/Ansatz)

V : Eingesetzte Menge an Zellextrakt

Extraktionspuffer	Bestimmung von ATP	ADP
Tris-HCl-Puffer	○	●
Tris-Na^+-K^+-Phoshatpuffer	▲	▼

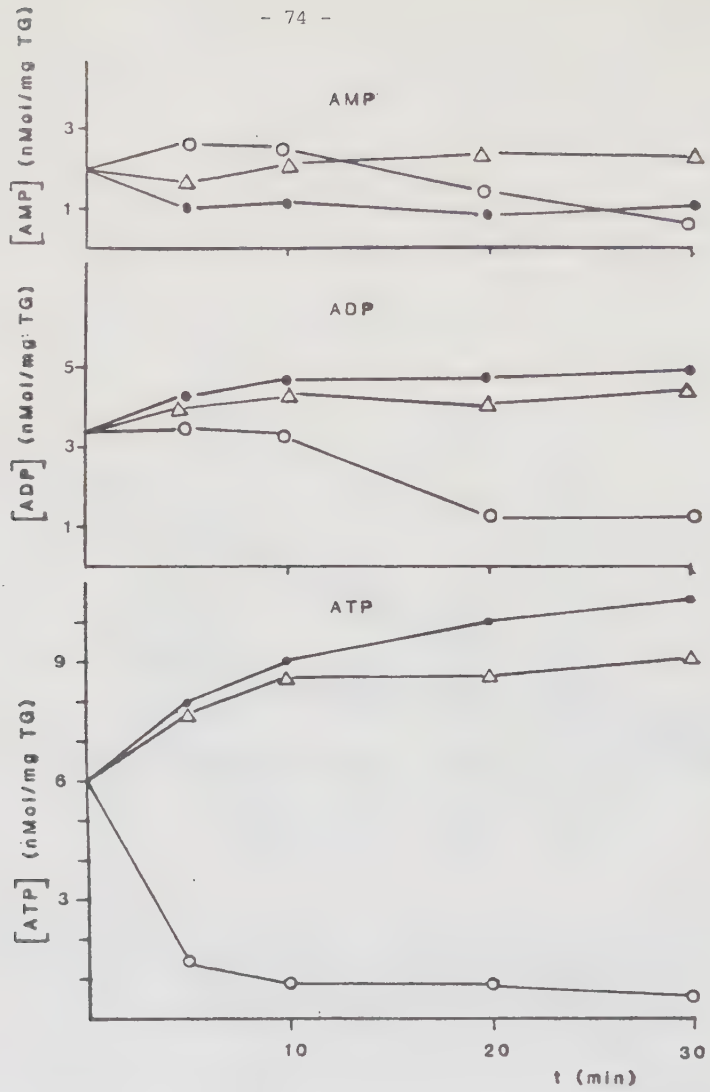


Abb. 4: Einfluß der Inkubationstemperatur auf den Adeninnucleotidgehalt der Zellen

- ● 30° C
- △ 12° C
- ○ 0° C

Inkubationspuffer: 50 mM K-Na-Phosphatpuffer, (pH 7,1) mit 1 % Glucose

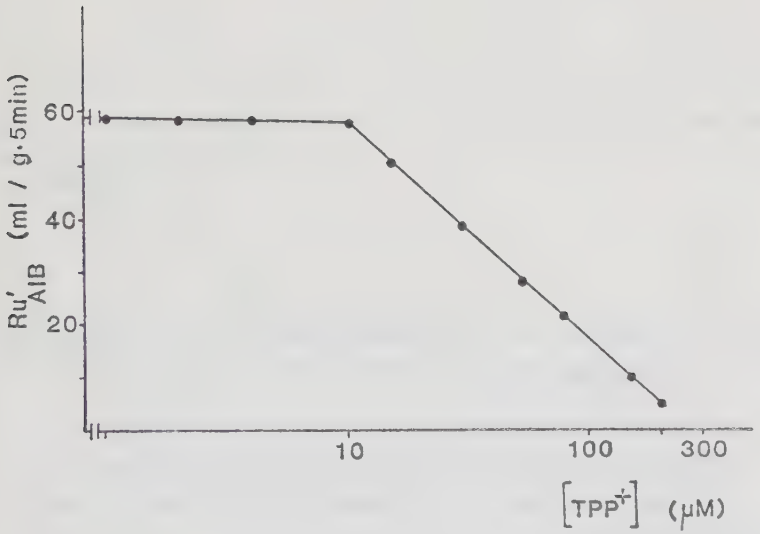


Abb. 5 : Einfluß von Tetraphenylphosphoniumchlorid (TPP^+) auf den AIB-Influx.

Gewaschene Zellen wurden 5 Minuten mit 1 mM ^{14}C-AIB und verschiedenen TPP^+-Konzentrationen in 50 mM MES-Tris-Puffer, pH 7,1 inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der Suspension entnommen und die ^{14}C-AIB-Aufnahme der Zellen bestimmt.

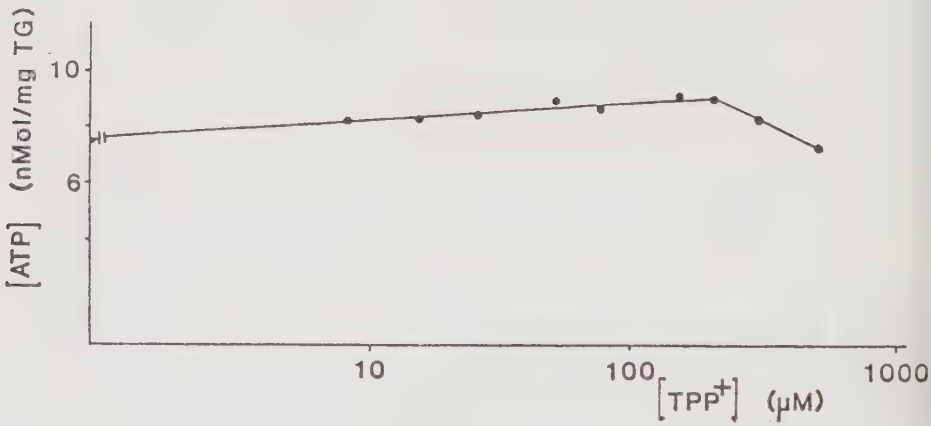


Abb.6 : Einfluß von TPP^+ auf die ATP-Spiegel von S. Hydrogenans in Gegenwart unterschiedlicher TPP^+-Konzentrationen.

Die Zellen wurden in 50 mM MES-Tris-Puffer, pH 7,1 , 8 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden je 2 ml der Suspension entnommen und der ATP-Gehalt der Zellen bestimmt.

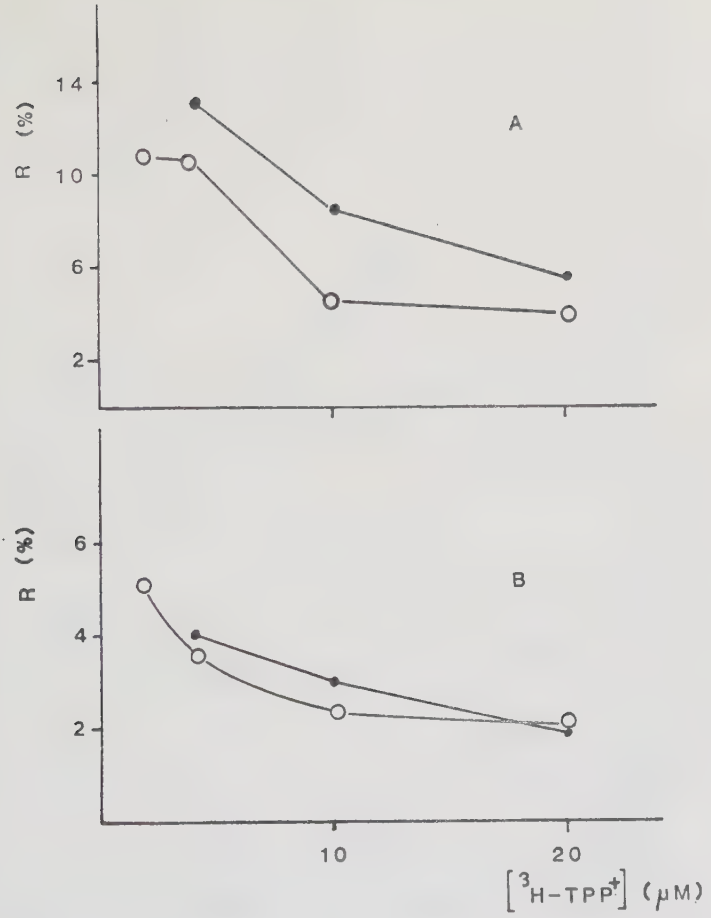


Abb. 7: Adsorption (R) von $^{3}H\text{-}TPP^{+}$ an Polycarbonat-Membranfilter(B) bzw. Membranfilterstützgitter (A)

- ● MES/Tris-Puffer 50 mM, pH 7,1
- ○ K -Na -Phosphat-Puffer, 50 mM, pH 7,1

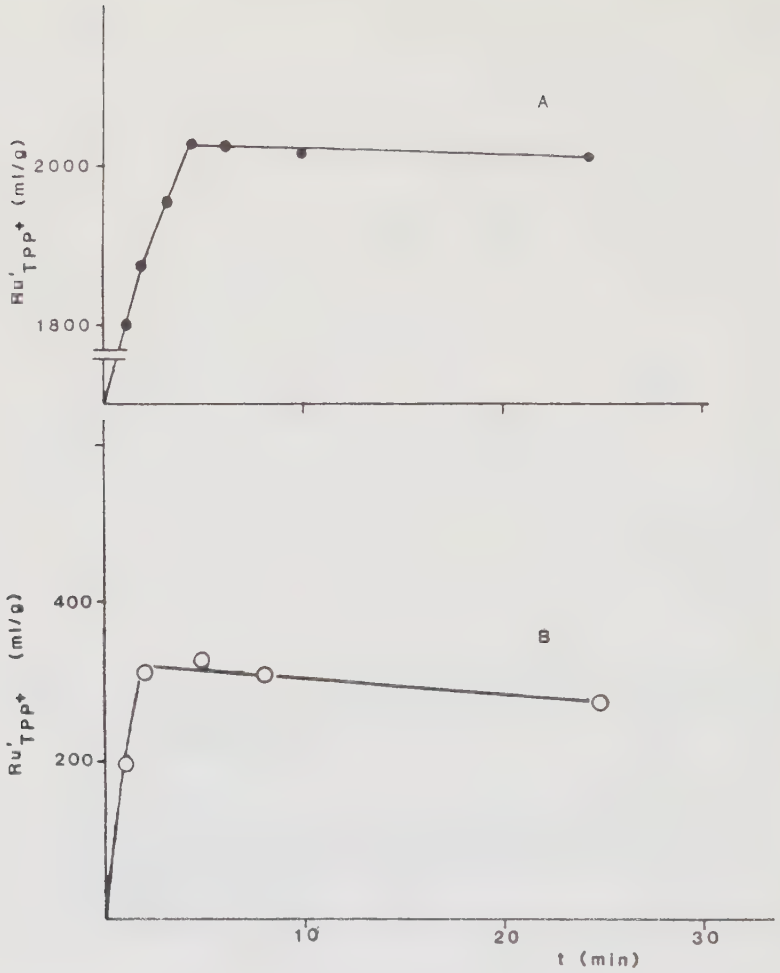


Abb. 8: Zeitabhängigkeit der TPP^+-Aufnahme in S.hydrogenans bei Suspension in MES-Tris-Puffer (A) und K^+-Na^+-Phosphatpuffer (B)

Vorinkubation: 50mM Puffer, pH 7,1, 35 min, 30° C
Inkubation mit ^{3}H-TPP^+ (10µM, 4,33 mCi/mMol) bei t = 0

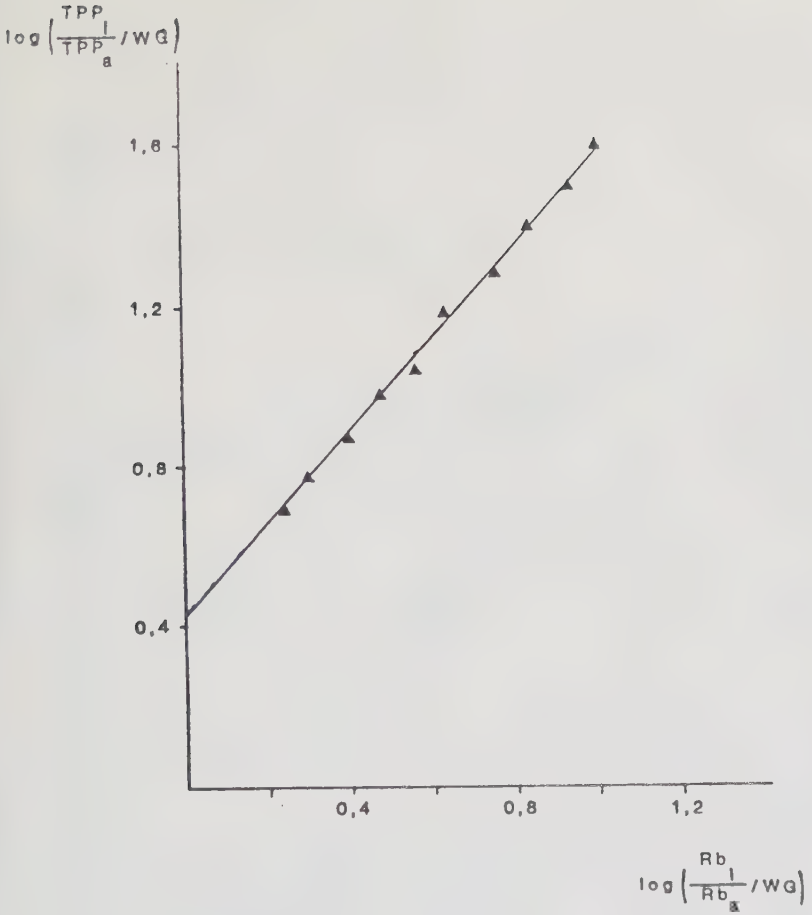


Abb. 9: TPP^+-Adsorption durch S. hydrogenans

WG = Wassergehalt der Zellen. (4 ml/g Trockenzellen)
Vorinkubation in MES-Trispuffer (50 mM, pH 7,1), 35 min bei 30°C
5 min Inkubation mit unterschiedlichen K^+-Konzentrationen und Nonactin (4,8µM)
5 min inkubation mit ^3H-TPP^+ bzw $^{86}Rb^+$

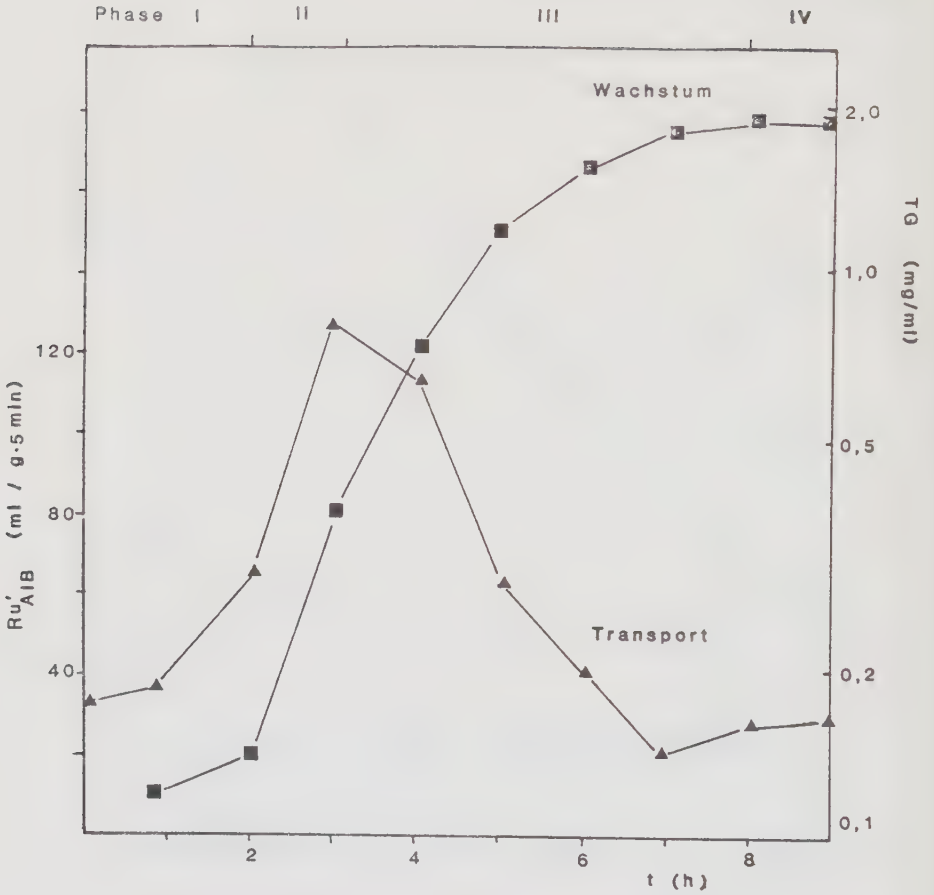


Abb. 10: Einfluß der Wachstumsphase auf den Influx von ^{14}C-AIB
linke Ordinate: AIB-Influx
rechte Ordinate: Kulturdichte (mg Zelltrockenmasse/ml Kultur)
Inkubationsbedingungen: MES-Trispuffer, 50 mM, pH 7,1
Vorinkubation 5 min
1mM ^{14}C-AIB (spez. Aktivität 80µCi/mMol)

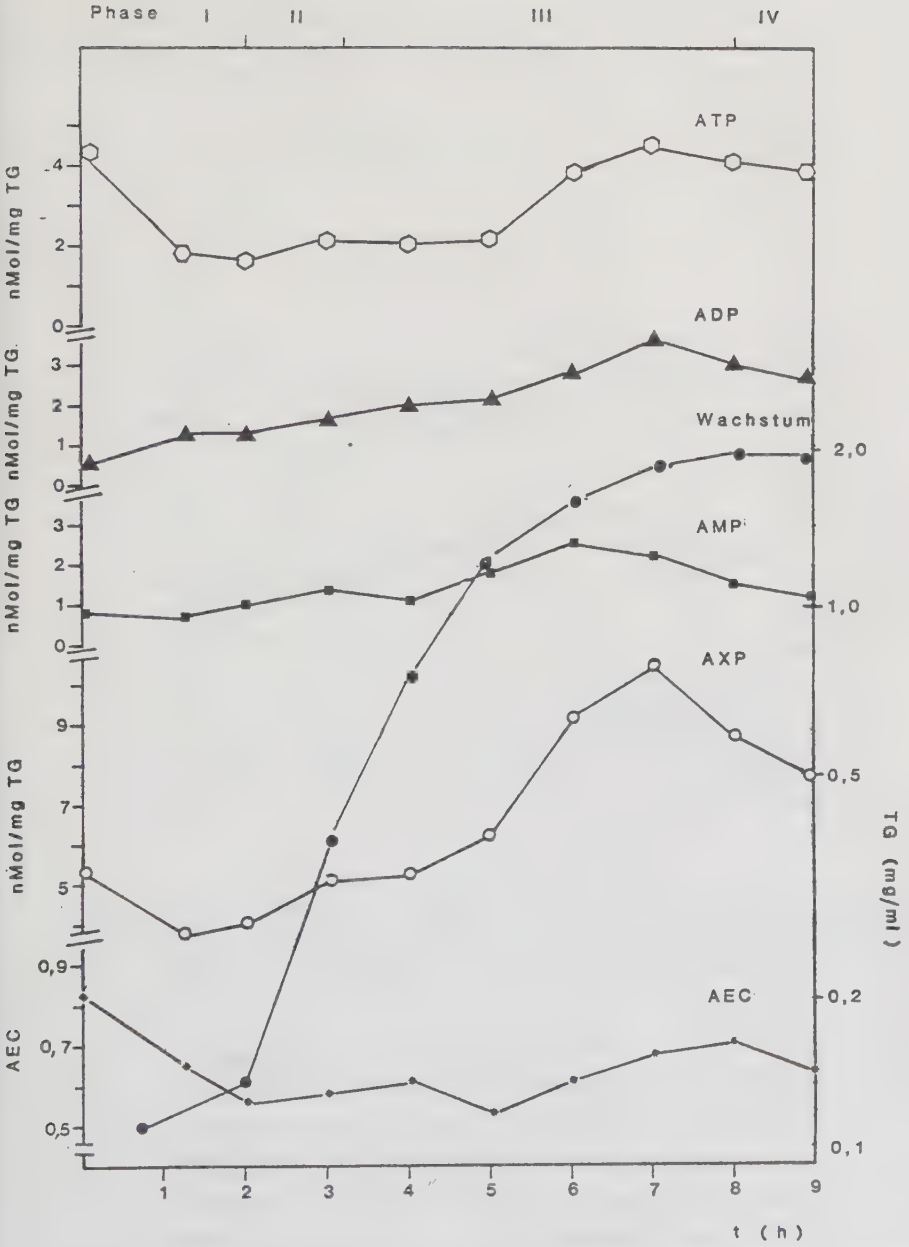


Abb. 11: Einfluß der Wachstumsphase auf die zellulären Adeninnucleotidkonzentrationen und die Adenylat-Energy-Charge

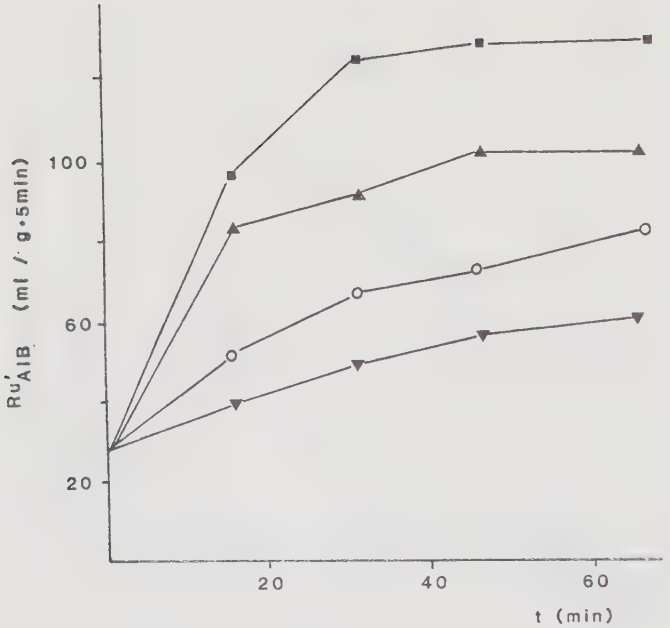


Abb. 12: Einfluß verschiedener Puffer auf den AIB- Influx

- ■ K-Na-Phosphatpuffer + 1% Glucose
- ▲ MES-Trispuffer + 1% Glucose
- ○ K-Na-Phosphatpuffer
- ▼ MES-Trispuffer

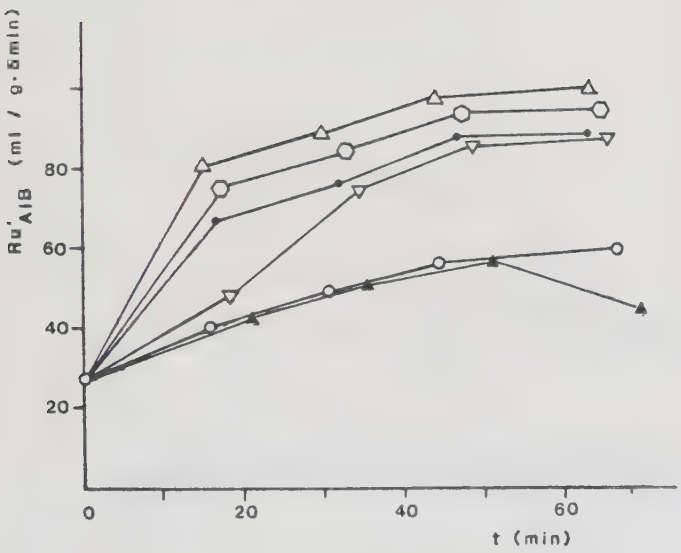


Abb. 13: AIB-Influx in Zellen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase als Funktion der Inkubationszeit in Gegenwart verschiedener Substrate (50 mM).

○ Kontrolle
▽ Glycerol
● Fructose
⬡ Mannose
△ Glucose
▲ DOG

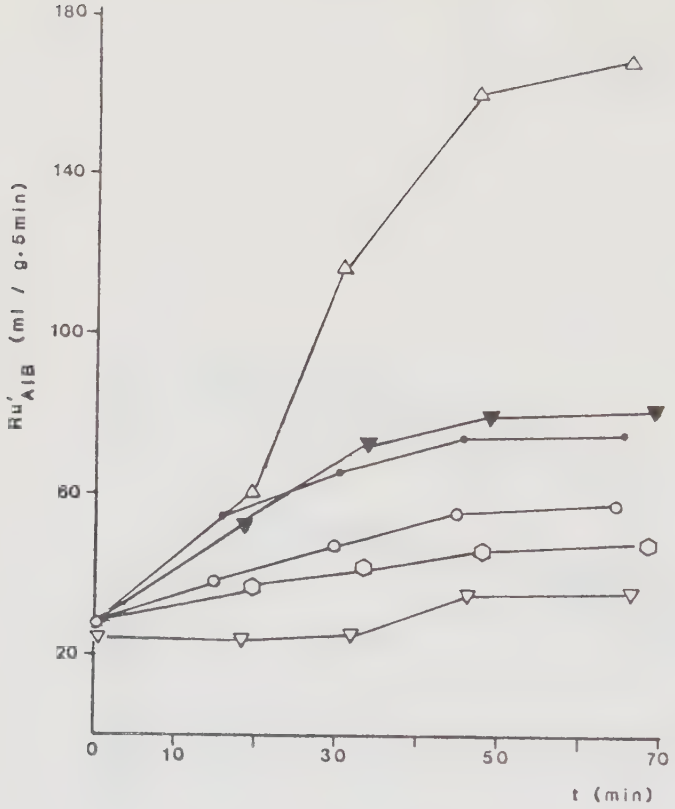


Abb. 14: AIB-Influx in Zellen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase als Funktion der Inkubationszeit in Gegenwart verschiedener Substrate (50 mM)

- ○ Kontrolle
- ⬡ NH_4Cl
- ▽ Na-n-Butyrat
- ● Succinat
- ▼ Adenosin
- △ L-Glutamat

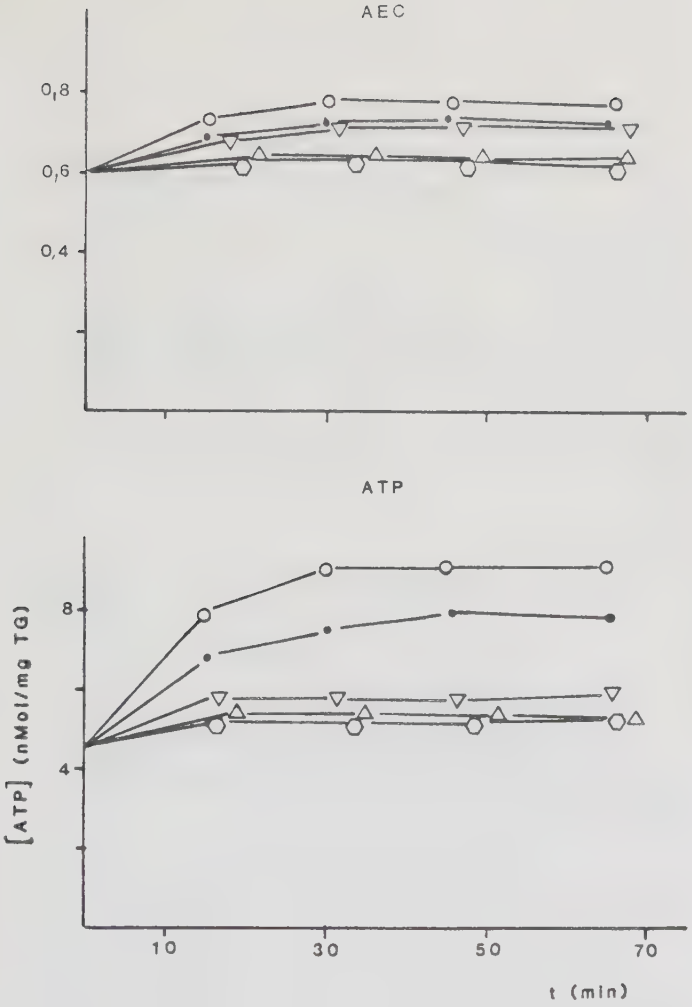
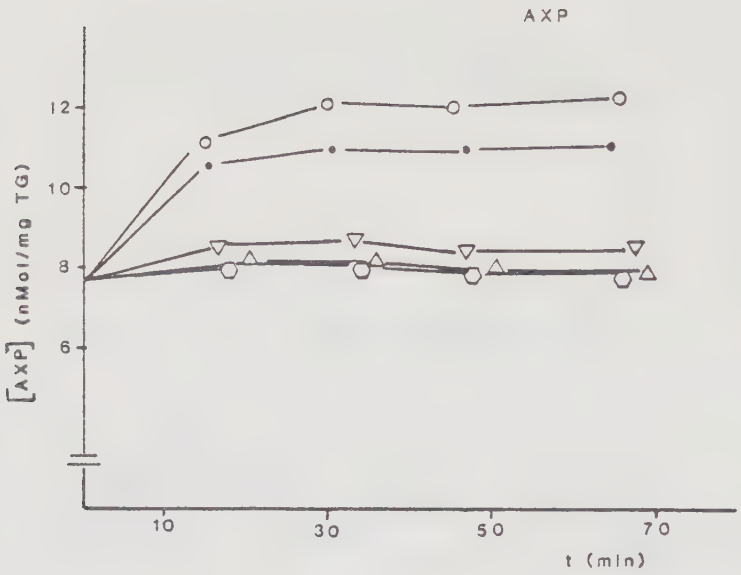


Abb. 15: Einfluß verschiedener Substrate auf den Adeninnucleotidgehalt der Zellen und die Adenylat-Energy-Charge

- ○ Kontrolle
- ● Fructose
- ▽ Glycerol
- △ Glucose
- ⬡ Mannose


AXP
12
10
8
6
[AXP] (nMol/mg TG)
10
30
50
70
t (min)

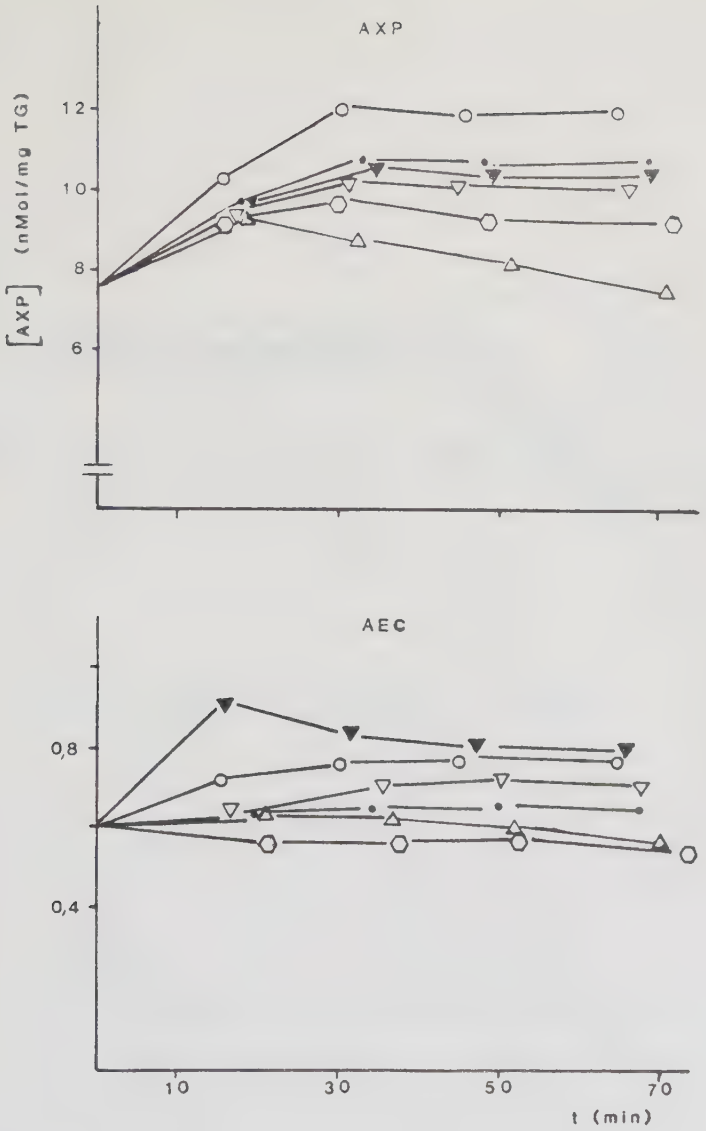
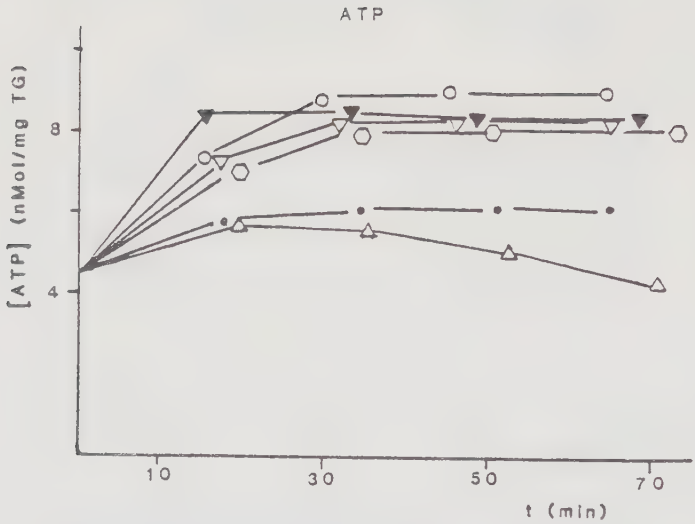


Abb. 16: Einfluß verschiedener Substrate auf den Adeninnucleotidgehalt der Zellen und die Adenylat-Energy-Charge

○ Kontrolle	▽ Na-n-Butyrat
● Succinat	⬡ NH_4Cl
△ L-Glutamat	▼ Adenosin


ATP
[ATP] (nMol/mg TG)
8
4
10
30
50
70
t (min)

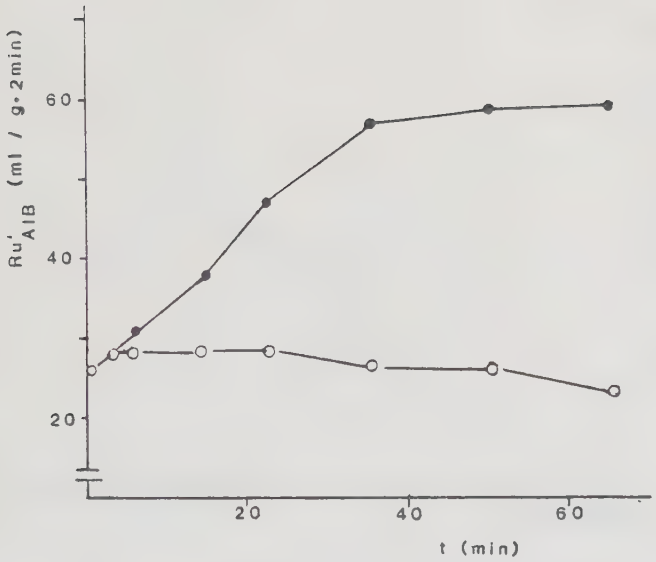


Abb. 17: Wirkung von Chloramphenicol (CAP) auf die AIB-Aufnahme

● Kontrolle ○ 0,1 mg CAP/ml

Inkubationspuffer: 50 mM K-Na-Phosphatpuffer mit 1 % Glucose pH 7,1

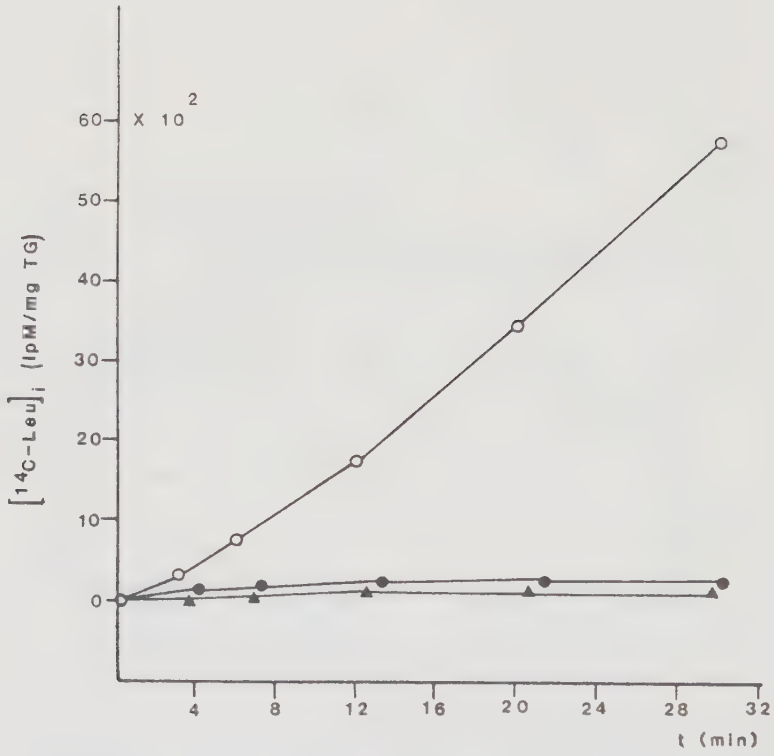


Abb. 18: Wirkung von CAP auf den Einbau von ^{14}C-Leucin

- ○ Kontrolle
- ● 0,1 mg CAP/ml
- ▲ 0,2 mg CAP/ml

10 min Vorinkubation mit CAP in MES-Trispuffer (50 mM, pH 7,1)
Inkubation mit ^{14}C-Leucin (1 mM) zum Zeitpunkt t = 0
Nach verschiedenen Zeiten je 2 ml Zellsuspension entnommen und diese mit 3 ml 10 % ge Perchlorsäure gemischt. Nach 2 min Reaktionszeit wurden die Proben filtriert, und die Radioaktivität des in Perchlorsäure unlöslichen Anteils bestimmt.

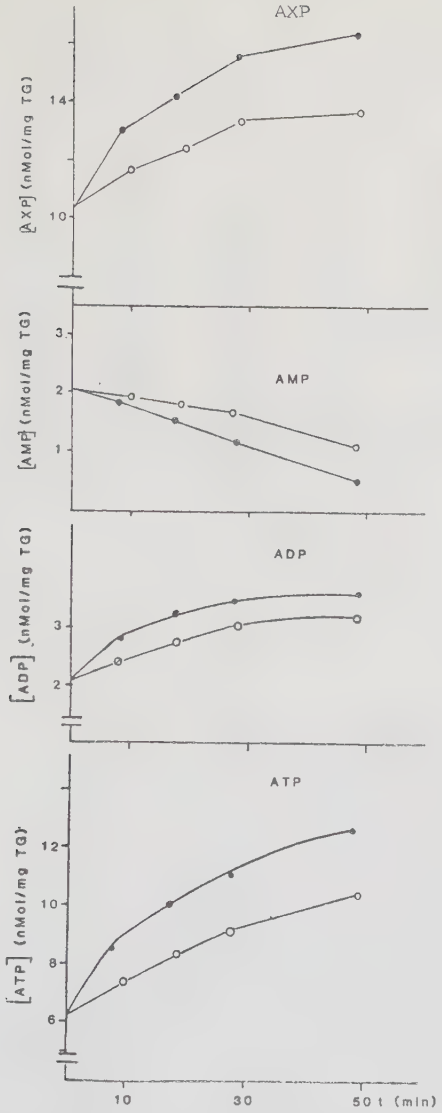


Abb. 19: Einfluß von CAP auf den Adeninnucleotid-Gehalt der Zellen

○ Kontrolle

● 0,1 mg CAP/ml

K-Na-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,1) + 1 % Glucose

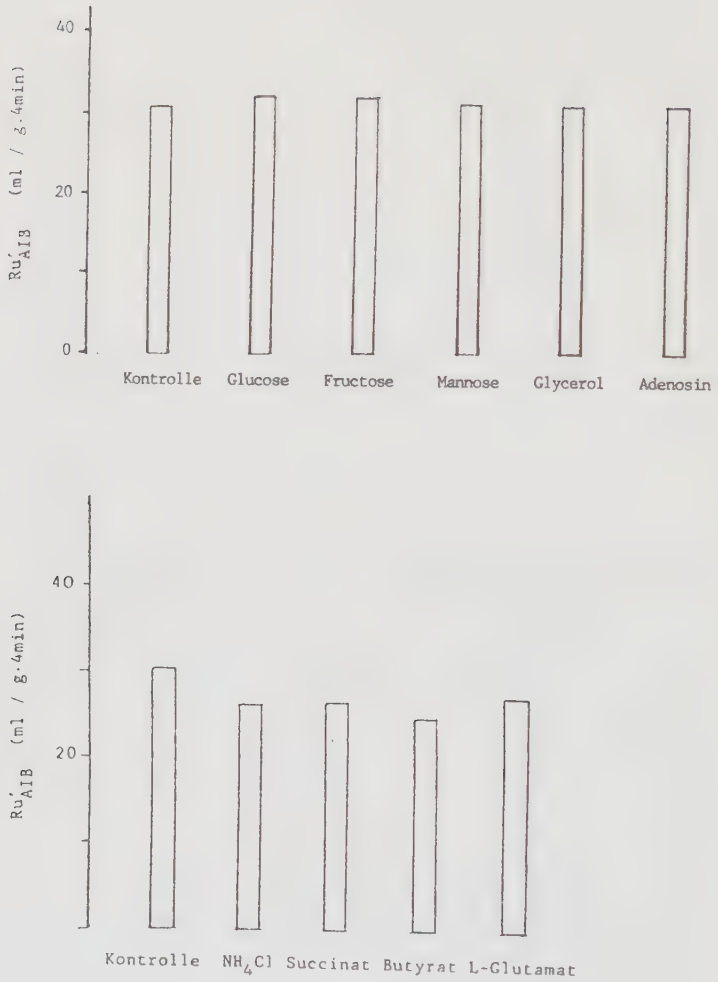


Abb. 20: Einfluß verschiedener Substrate auf den AIB-Influx in Zellen aus der spätexponentiellen Wachstumsphase bei gehemmter Proteinsynthese

Nach 12 min Vorinkubation bei 30°C in MES-Trispuffer (50 mM, pH 7,1) in Gegenwart von CAP (0,1 mg/ml) und anschießender Inkubation mit verschiedenen Substraten (50 mM, 50 min) wurde die AIB-Aufnahme bestimmt.

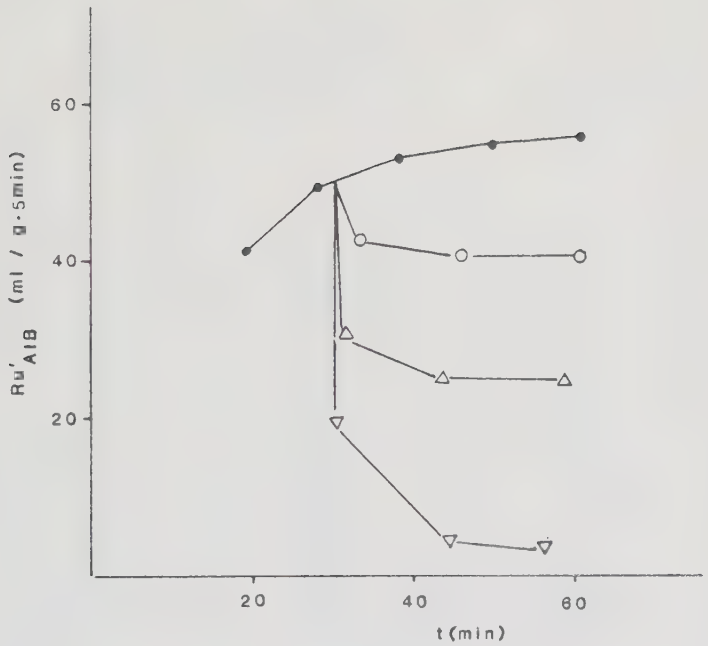


Abb. 21: Hemmung des AIB-Transportes durch DCCD

- ● Kontrolle
- ○ 0,1 mM DCCD
- △ 0,5 mM DCCD
- ▽ 1,0 mM DCCD

Inkubationsbedingungen: MES-Trispuffer, 50 mM, pH 7,1
$30^{0}C$

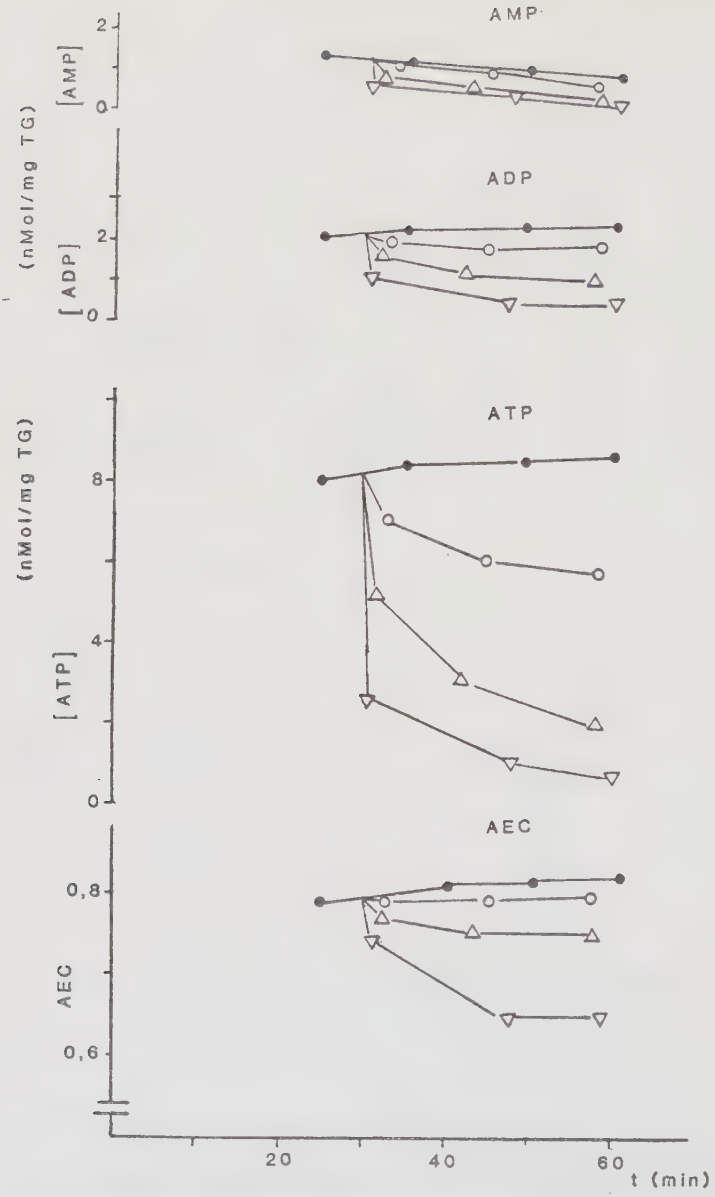


Abb. 21 A: Verminderung des Adeninnucleotidgehaltes durch DCCD

- ● Kontrolle
- ○ 0,1 mM DCCD
- △ 0,5 mM DCCD
- ▽ 1,0 mM DCCD

Inkubationsbedingungen:
MES-Trispuffer, 50 mM, pH 7,1
30 °C

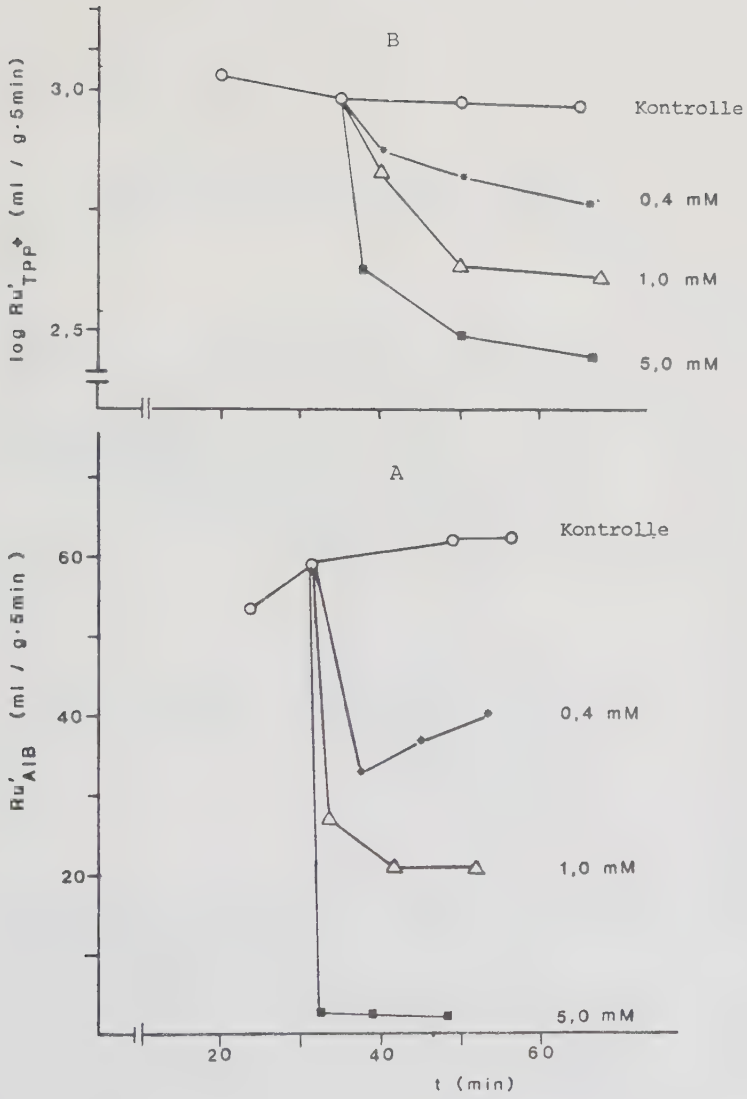
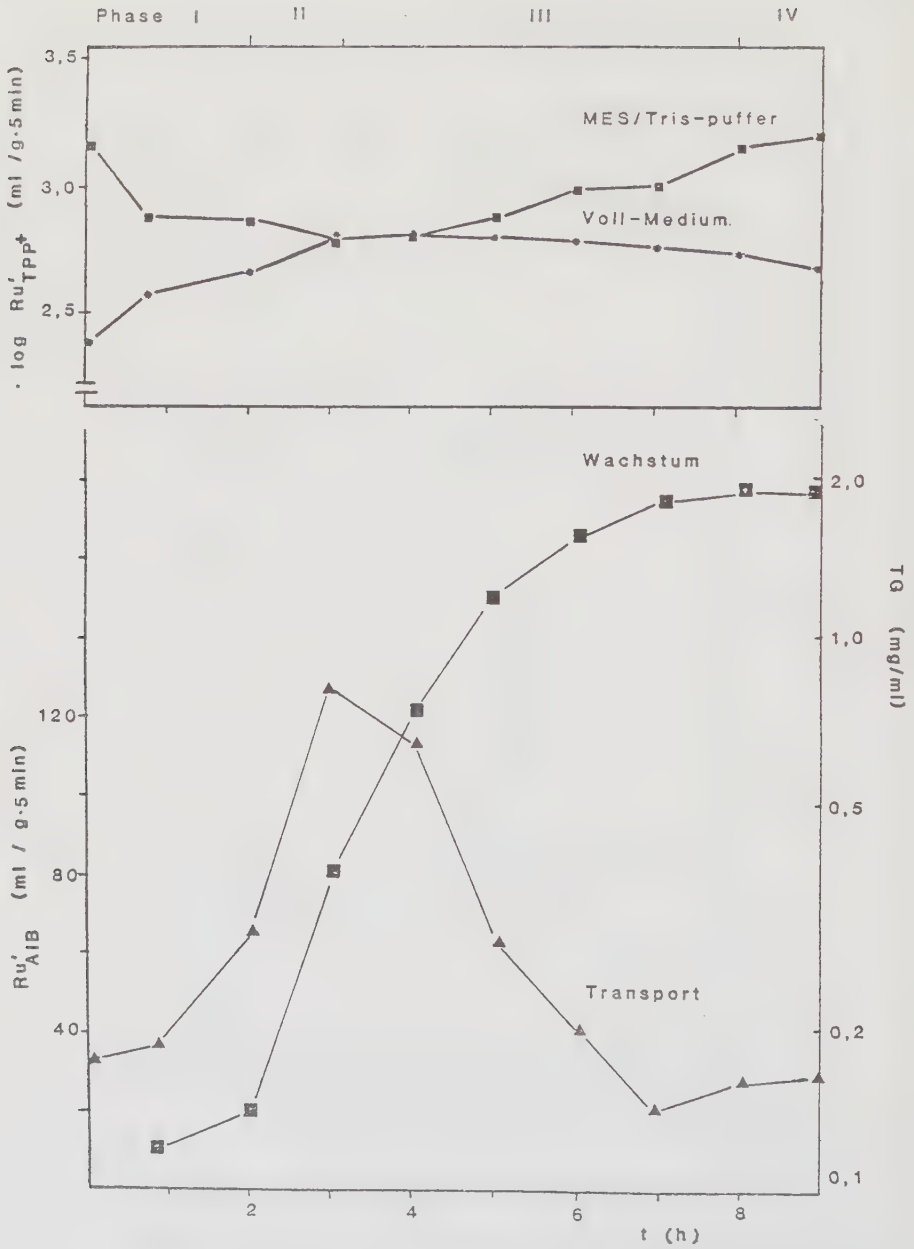


Abb. 22: Einfluß von KCN auf AIB-Transport (A) und TPP^+ - Verteilung (B)



Abbb. 23: Einfluß der Wachstumsphase auf AIB - und TPP^+ - Aufnahme
Vorinkubation 5 min bei 30°C

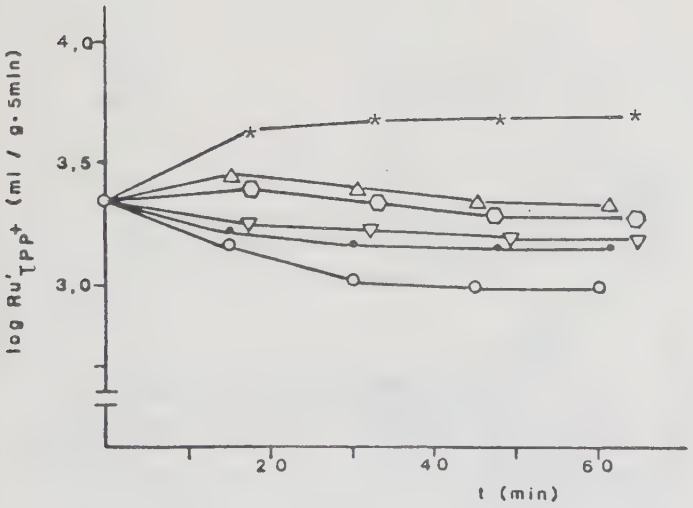


Abb. 24: Änderung der TPP^+-Verteilung während der Inkubation mit verschiedenen Substraten (50 mM)

○	Kontrolle	⬡	Mannose
●	Fructose	△	Glucose
▽	Glycerol	*	2-Deoxiglucose

Inkubationsbedingungen: 50 mM MES-Trispuffer, pH 7,1

30^0C

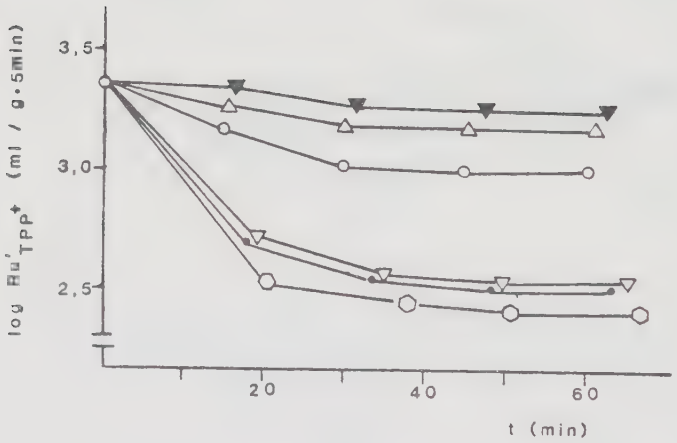


Abb. 25: Änderung der TPP^+-Verteilung während der Inkubation mit verschiedenen Substraten (50 mM)

- ○ Kontrolle
- ● Succinat
- △ L-Glutamat
- ⬡ NH_4Cl
- ▼ Adenosin
- ▽ Na-n-Butyrat

Inkubationsbedingungen siehe Abb. 24

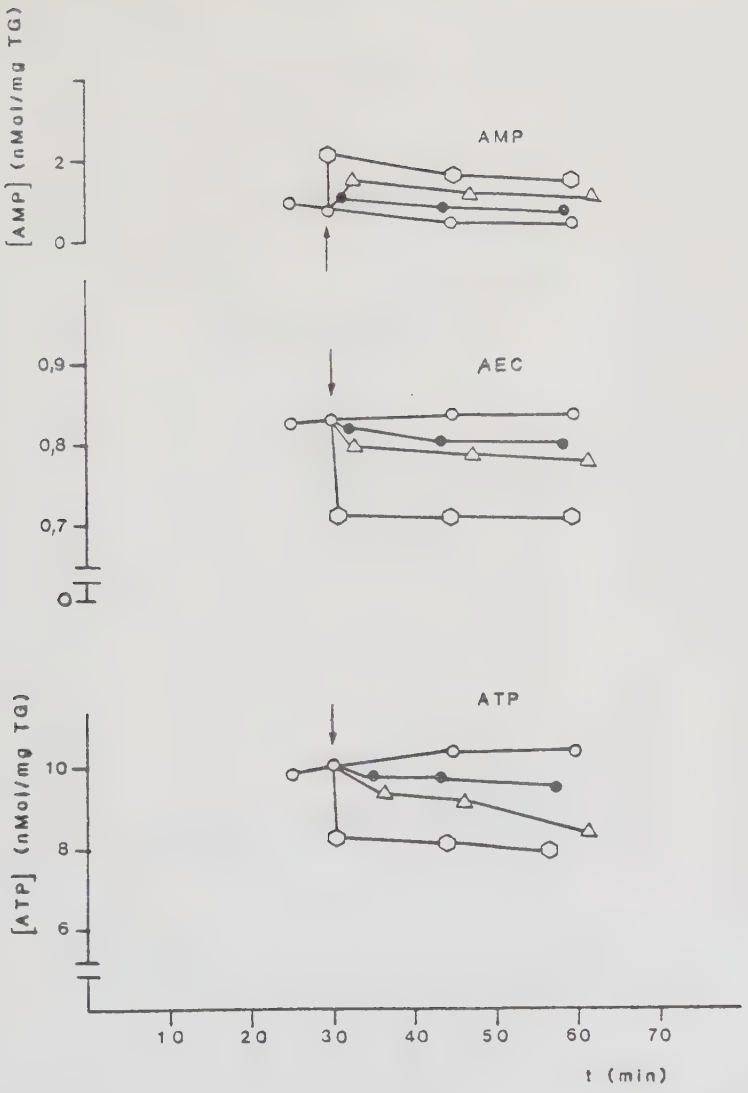


Abb. 26: Änderung der ATP- und AMP-Konzentration und der Adenylat Energy Charge durch Nigericin

- ○ Kontrolle
- ● 5,94. 10^{-8} M
- △ 5,94. 10^{-7} M
- ⬡ 5,94. 10^{-6} M

Inkubationsbedingungen:
K-Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,1
30°C

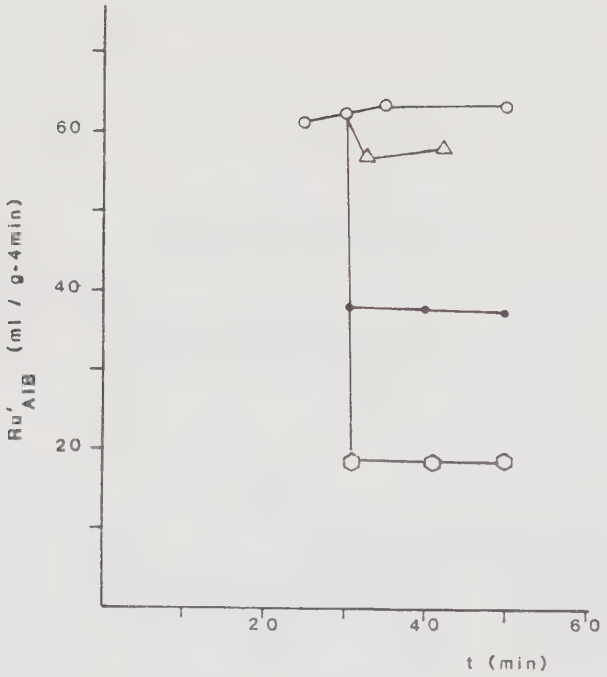


Abb. 27: Hemmung des AIB-Transportes durch Nonactin

○ Kontrolle
△ 1,29 µM
● 12,9 µM
⬡ 74,6 µM

Inkubationsbedingungen:
K-Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,1
30°C

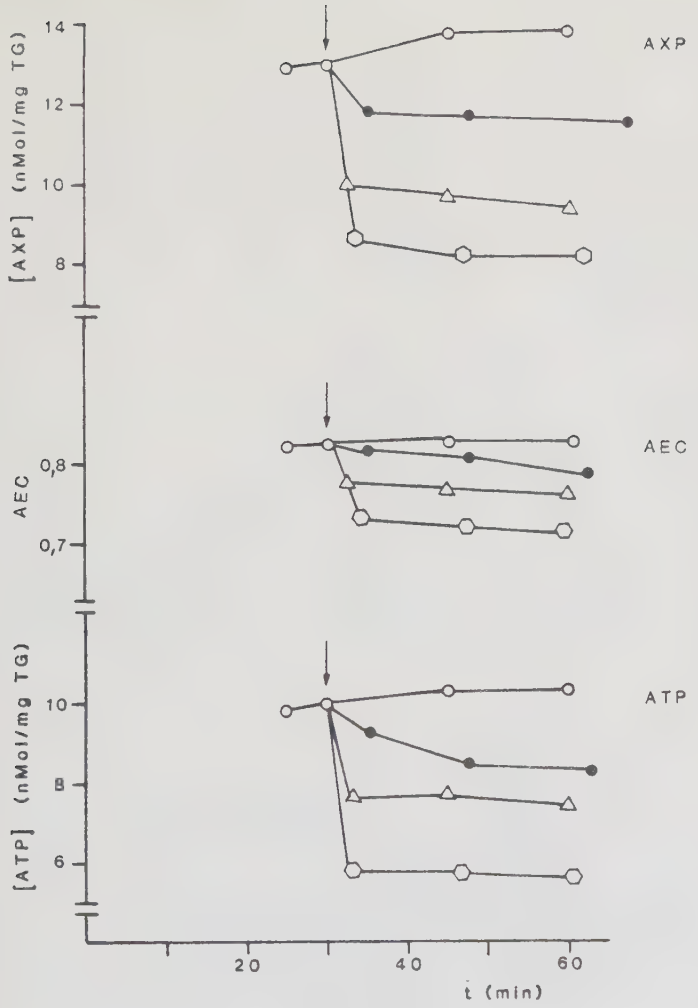


Abb. 28: Verminderung des ATP- und AXP-Gehaltes und der Adenylat Energy Charge durch Nonactin

- ○ Kontrolle
- ● 1,29 µM
- △ 12,9 µM
- ⬡ 74,6 µM

Inkubationsbedingungen:
K-Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,1
30°C

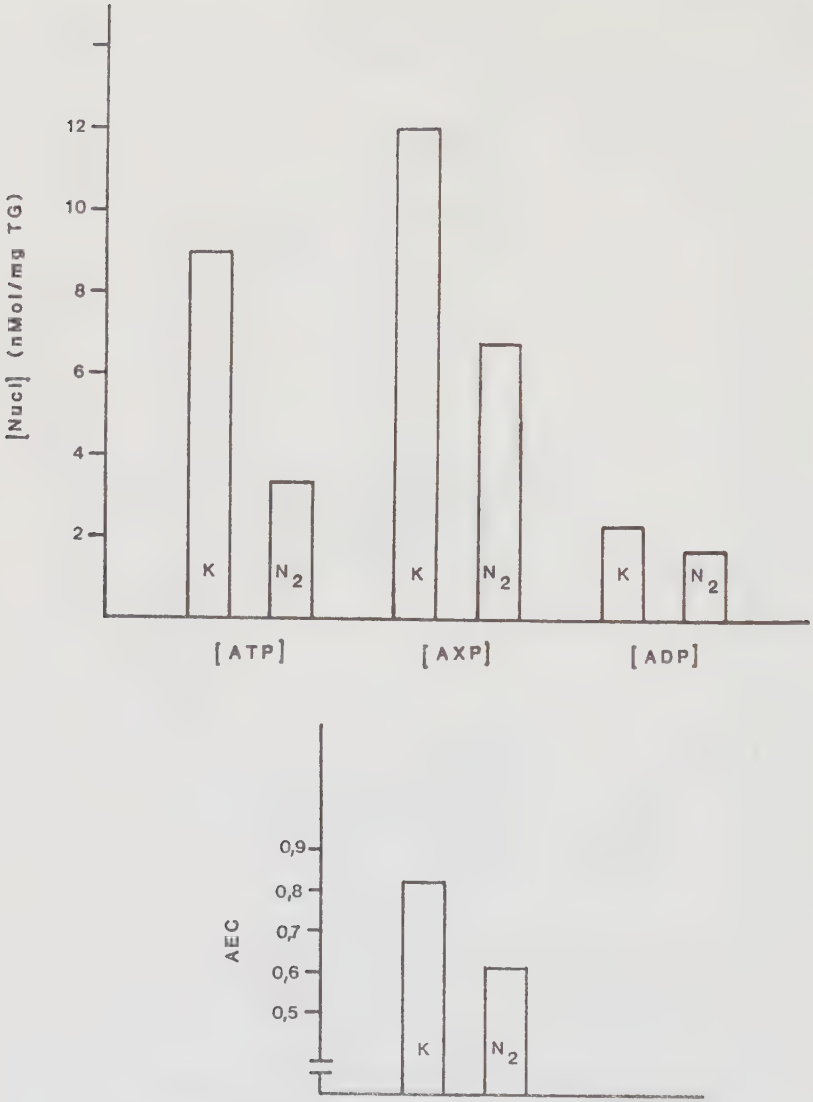


Abb. 29: Einfluß von N_2 auf die Adeninnukleotidkonzentration(Nucl) und die Adenylat-Energy-Charge

K = Zellen nach 50 Minuten Inkubation unter aeroben Bedingungen

N_2= Zellen nach 50 Minuten Begasung mit N_2

Inkubationsbedingungen: K-Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,1, 30°C mit 1% Glucose

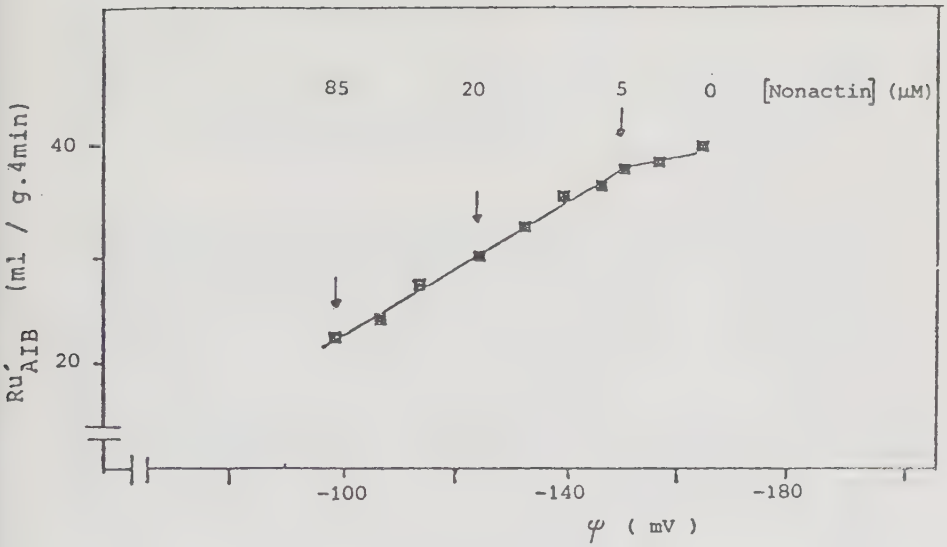


Abb. 30 Einfluß der Veränderung des Membranpotentials auf die AIB-Aufnahmekapazität.

Die Veränderung des Membranpotentials erfolgte durch Zugabe steigender Mengen an Nonactin bei konstanter K^+-Konzentration im Medium (MES-Trispuffer mit 150 mM KCl)

AIB-Konzentration: 20 µM

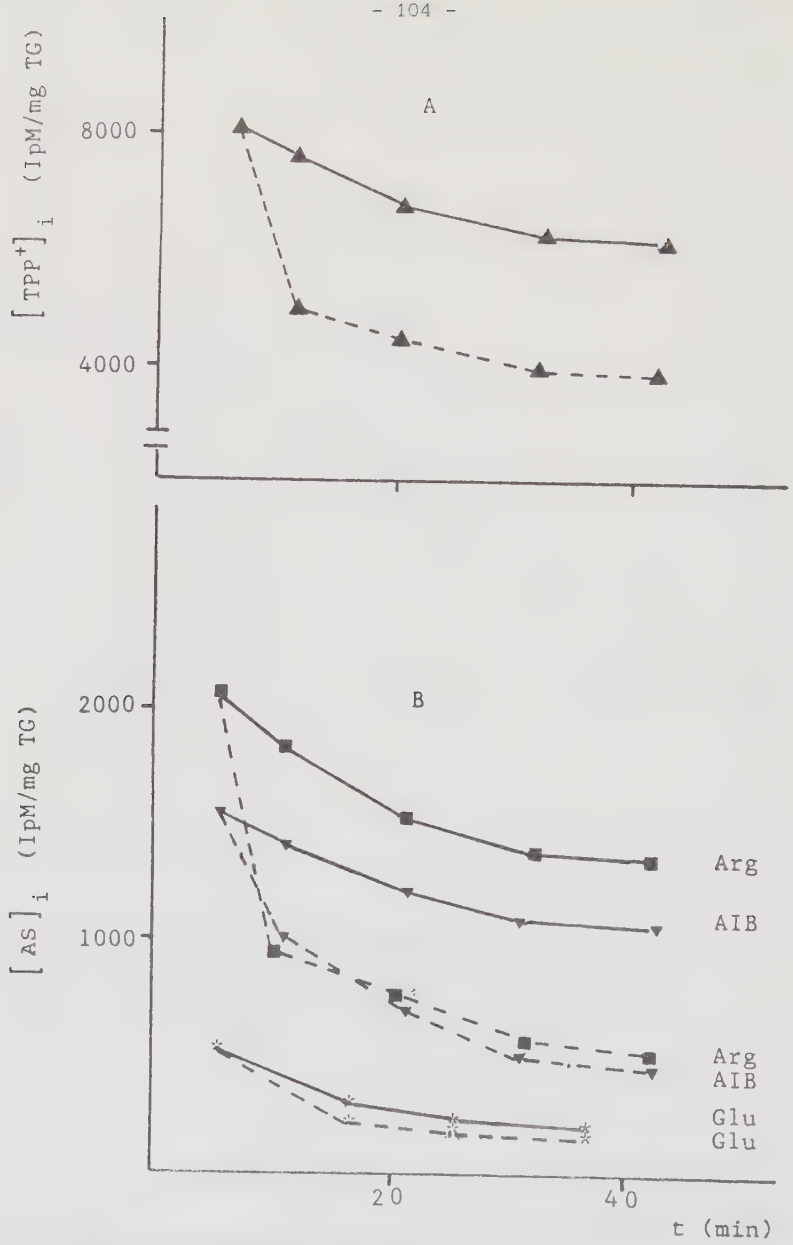


Abb. 31: Einfluß der Veränderung des Membranpotentials auf die Aufnahme verschiedener Aminosäuren bei gehemmten Zellen

A: TPP^+ - Aufnahme
B: Aminosäurenaufnahme
Durchgezogene Linien: Inkubation ohne Nonactin
Gestrichelte Linien: Inkubation mit 12,9 µM Nonactin
Aminosäurenkonzentration: Arg 15, Glu und AIB 20 µM

Zellen wurden in MES-Tris-Pufffer (50 mM pH 7,1 5 mM KCl) inkubiert. Atmung und Glykolyse der Zellen wurden durch Zugabe von KCN (0,4 mM), Jodessigsäure (2 mM) gestoppt. Nach 10 Minuten wurde DCCD (0,5 mM) zugesetzt und nach weiteren 7 Minuten Proben von je 3 ml für die Transportversuche entnommen. Der Aufnahme von AIB, Arg, Glu, und TPP^+ wurde nach 4 Minuten bestimmt. Diese Messungen ergaben die 0-Werte.

Die restlichen mit KCN, Jodessigsäure und DCCD behandelte Zellsuspension wurde halbiert. Bei einer Hälfte wurde durch Zusetzten von 12,9 µM Nonactin (in Äthanol gelöst) das Membranpotential reduziert. Dem anderen Teil der Zellsuspension wurde eine äquivalente Menge Äthanol zugesetzt.
Nach verschiedenen Zeiten wurden 3 ml Fraktionen aus beiden Zellsuspensionen entnommen und die Aufnahme von AIB, Arg, Glu, und TPP^+ nach 4 Minuten Inkubation bestimmt.

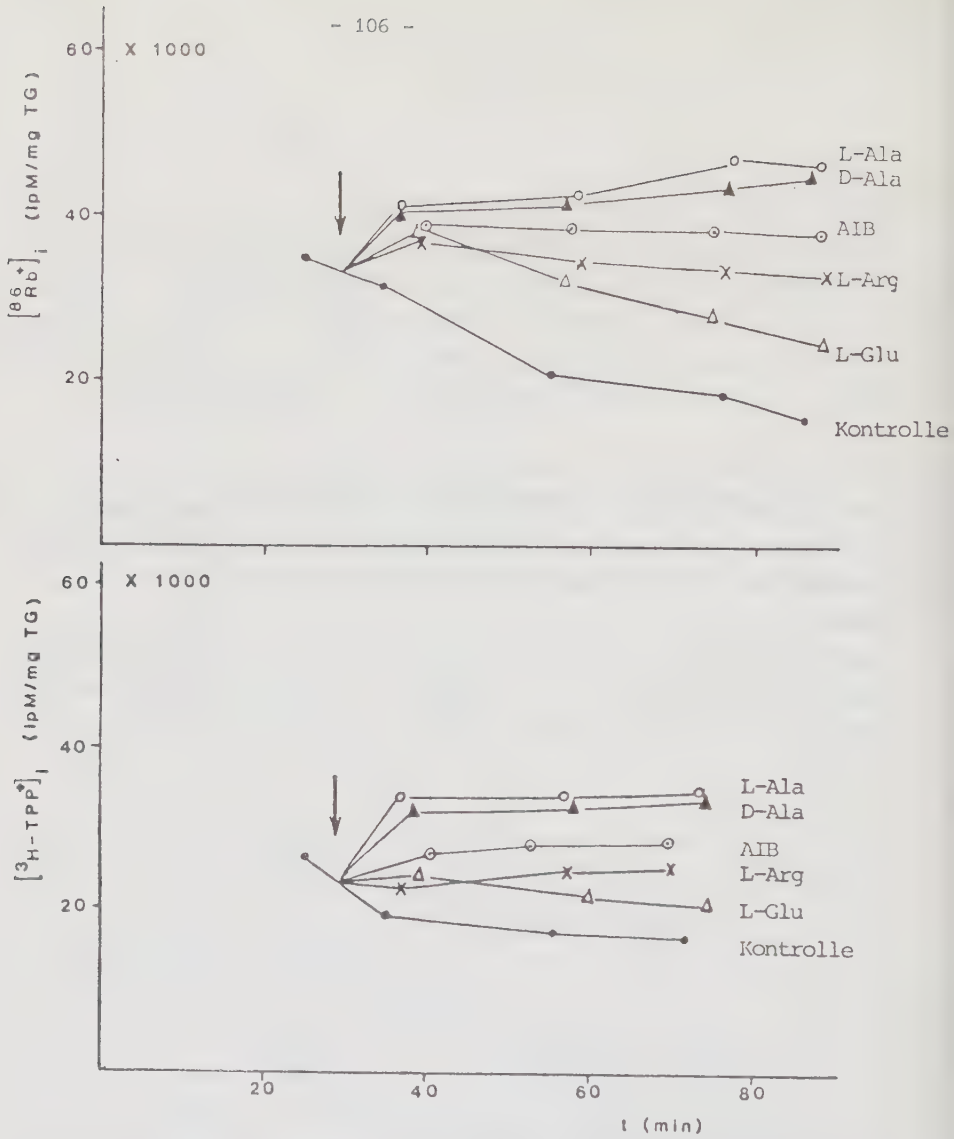


Abb. 32: Hyperpolarisierung der Zellmembran durch Aufnahme verschiedener Aminosäuren. Puffer: MES-Tris, 50 mM, pH 7,1;
Aminosäurenkonzentration: 1 mM
A = $^{86}Rb^+$ - Aufnahme
B = $^{3}H\text{-}TPP^+$ - Aufnahme

Die Zellen wurden bei 30° C in Wasserbad unter Schütteln im MES-Tris-Puffer (50 mM, pH 7,1) inkubiert. Nach 30 Minuten wurde eine der angegebenen Aminosäuren (1 mM) zugegeben und anschließend zu verschiedenen Zeiten die Aufnahme von ^{3}H-TPP^{+}, und $^{86}Rb^{+}$ (4 Minuten) bestimmt. Die $^{86}Rb^{+}$-haltigen Ansätze enthielten Zusätze von KCl (5mM) und Nonactin (12.9×10^{-6} M).

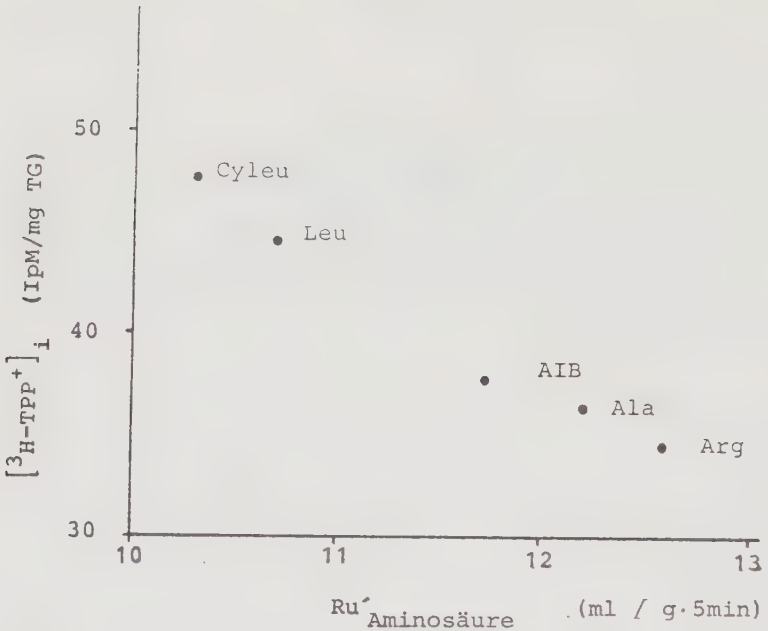


Abb. 33: Verminderung der TPP^+ - Verteilung in Abhängigkeit vom Aminosäuretransport bei stoffwechselgehemmten Zellen.

Nach Vorinkubation der Zellen für 30 Minuten bei 30°C in MES-Tris-Puffer (50mM, pH 7,1) wurden 0,4 mM KCN, 2 mM Jodessigsäure und 0,5 mM DCCD zugesetzt und die Ansätze für weitere 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen ^{14}C-markierten Aminosäuren (20 µM) zugesetzt und ihre Aufnahme nach 5 Minuten gemessen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der TPP^+ - Aufnahme (4 min.)

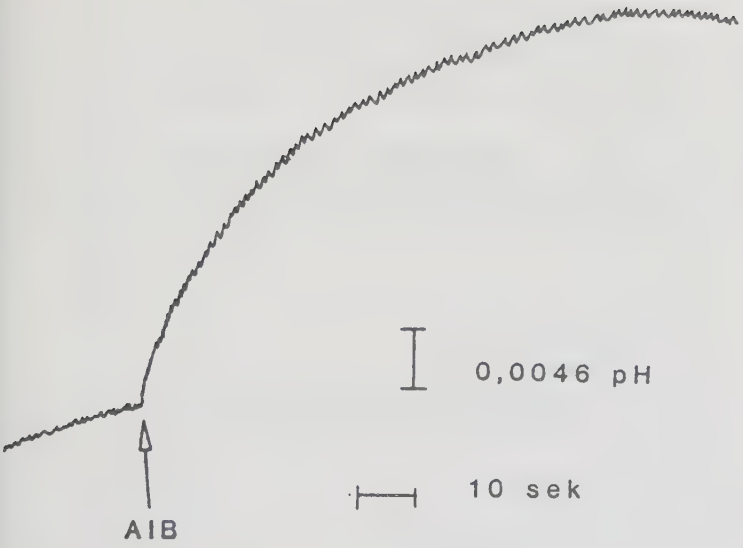


Abb. 34: pH-Änderung des Mediums nach Zugabe von 1 mM AIB bei Inkubation der Zellen unter anoxischen Bedingungen

Zellmenge: 4,0 mg/ml
Volumen in der Küvette: 20 ml

Abkürzungen

Aminosäuren wurden in der üblichen Weise abgekürzt; wenn nicht anders bezeichnet, stellen die genannten Aminosäuren die L-Form dar.

AEC	Adenylate energy charge
a'_f	Radioaktivität (IpM) pro ml Filtrat
AIB	2-Aminoisobuttersäure
AMP, ADP, ATP	Adenosin-(mono,di,tri)-phosphat
CAP	Chloramphenicol
Cyleu	Cycloleucin (1-Aminocyclopentan-1-Carbonsäure)
DCCD	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Dinitrophenol
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DOG	2-Desoxi-D-glucose
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon
Glc	Glucose
IpM	Impulse pro Minute
M.K.	Myokinase
MES	N-Morpholinoäthansulfonsäure
OpM	Oszillationen pro Minute
PEP	Phosphoenolpyruvat
P.K.	Pyruvatkinase
PMF	Proton Motive Force
$Ru'=u'_c/u'_f$	relative Aufnahme bzw. Anreicherung
TG	Trockengewicht der Zellsuspension in mg/ml
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u'_c	Radioaktivität (IpM) pro Gramm Zelltrockengewicht
UpM	Umdrehungen pro Minute
WG	Wassergehalt der Zellen (bei S.hydrogenans ca.4 ml/g Zelltrockengewicht)
φ	Membranpotential

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. K. Ring danke ich herzlich für sein reges Interesse an meiner Arbeit und seine großzüzige Unterstützung. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge sowie seine Hilfe bei der sprachlichen Formulierung meiner Arbeit waren mir eine große Hilfe.

Herrn Dr. D. Blöcher und Herrn Priv. Doz. Dr. habil. P. Geck danke ich besonders für ihre hilfreichen Diskussionen.

Mein Dank gilt auch Frau B. Henkel und Frau E.Mieke, die mir freundlicherweise bei der Durchführung der Experimente assistierten.

Lebenslauf

Am 30.5.1945 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Uthup Chacko und seiner Ehefrau Annamma, geb. Pathiyil, in Kaipuzha, Kerala, Indien geboren.

Von 1951 bis 1958 besuchte ich die Grundschule und "Middle School" in Kaipuzha und anschließend bis 1962 die "High School" in Ranchi.

Februar 1962 bestand ich die "Annual Secondary School Examination" und 1966 die "Pre-University"-Prüfung. Von 1966 bis 1969 studierte ich am St.Xavier's College Chemie und Biologie und bestand im Juli 1969 das "Bachlor of Science"-Examen. Während dieser Zeit habe ich auch eine Ausbildung als Bibliothekar an einer staatlich anerkannten Institution absolviert. Von 1969 bis 1970 übte ich die Tätigkeit eines Aushilfslehrers im Staate Uter Pradesh aus.

1970 kam ich nach Deutschland. Nach einem Deutschkurs am Goethe-Institut in Rothenburg ob der Tauber habe ich mit dem Studium der Biologie begonnen. Oktober 1975 legte ich den mündlichen Teil der Diplom-Hauptprüfung in Köln ab. Von November 1975 bis Oktober 1976 fertigte ich meine Diplomarbeit im Biochemischen Institut der Universität Köln an.

Seit November 1976 bin ich im Zentrum der Biologischen Chemie, Universitätskliniken, Frankfurt am Main als wiss. Mitarbeiter tätig

Frankfurt am Main, den 7.6.83

Thomas Tharayil.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Ist der aktive Transport neutraler Aminosäuren bei Streptomyces hydrogenans Carrier- oder Energie-limitiert ?

im Zentrum der Biologischen Chemie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Ring ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main den, 7.6.83

Thomas Thorayil.